

MAURICIO TERUO TADA

Análise dos genes *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* e *ABCG8* em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Dr. Alexandre da Costa Pereira

São Paulo

2022

MAURICIO TERUO TADA

Análise dos genes *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* e *ABCG8* em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Dr. Alexandre da Costa Pereira

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tada, Mauricio Teruo

Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em
pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico
molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9
/ Mauricio Teruo Tada. -- São Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Hipercolesterolemia 2.Fitosteróis
3.Xantomatose 4.Doença cardiovascular
5.Hipercolesterolemia familiar

USP/FM/DBD-210/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha “batian” Tatsue Tada (in memorian), por ter me ensinado o que é bondade, saudade, por ter contribuído na minha educação e por me tornar na pessoa que sou hoje. Sei que de algum lugar, ela olha por mim.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Alexandre da Costa Pereira, por ter confiado a mim este trabalho. Obrigado por todo o ensinamento, paciência e incentivo.

À Cinthia, Isa, Karina e Théo, por todo o aprendizado, pelas risadas e pela companhia por todos esses anos. Sou grato por ter feito parte do Hipercol Brasil com vocês. Momentos que guardarei para toda a vida. Obrigado também pela preocupação com a minha batian durante todo esse período de pandemia e por ouvirem as peripécias aprontadas por ela.

Ao Expedito, Luan e Lucas, pela amizade, humildade e parceria durante todos esses anos. Obrigado por todo o apoio, e por vezes, me tirarem da rotina para espaiar um pouco. Obrigado pelas viagens, idas à praia e pelas partidas de bilhar. Amigos como vocês são poucos.

À Erika, pela amizade que se estendeu desde a faculdade, por todo o companheirismo, incentivo e por ter me arrastado para o fascinante mundo da Biologia Molecular. Feliz em hoje, poder trabalhar lado a lado, compartilhando mágoas e alegrias, um sendo o suporte do outro. Obrigado por tudo!

À Hiromi, Mayu, Suemy e Will, meus “tomodachis”, pela amizade de tantos anos, pelos passeios, pelos cafés, pelos joguinhos, pelas risadas e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus pais, irmãos e familiares, por acreditarem em mim e por me acompanharem a cada passo.

Aos meus colegas, funcionários e alunos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, pela parceria, aprendizado e por terem me ajudado no desenvolvimento do projeto.

Aos médicos da Unidade Clínica de Lípidos do InCor: Dra. Ana Paula, Dr. Márcio, e em especial ao Dr. Raul e Dra. Vivi, por todo o companheirismo, competência e ensinamento. Obrigado pelo acolhimento de toda a equipe!

À Dra. Edna e Dra. Valéria, pela disponibilidade e parceria na dosagem dos fitosteróis. Vocês agregaram muito para o resultado deste trabalho. Muito obrigado!

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Samaritano Américas, pelo acolhimento, respeito e companheirismo. Obrigado pelos cafés, risadas e pelos plantões de finais de semana e feriados. À Andrea, ao Bruno e a Naty, pela cumplicidade, apoio, incentivo e por tornar o meu dia mais agradável. À Paty, que mesmo não trabalhando mais com a gente, deixou sua marca, com sua bondade e seu carisma.

À CAPES pelo apoio financeiro durante a execução deste projeto.

Obrigado a todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho!

“O mundo ainda dará muitas voltas e as circunstâncias desfavoráveis irão se tornar favoráveis para que você possa alcançar seus sonhos.

Basta acreditar e lutar todos os dias por isso.

Nem a maior das tempestades dura para sempre e o mesmo acontecerá com suas provações.

Persevere mais um pouco, pois em breve tudo fará parte do passado.”

Autor desconhecido

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo.....	18
Abstract	19
1. Introdução.....	1
1.1. Hipercolesterolemia Familiar	1
1.2. Diagnóstico Clínico	4
1.3. Diagnóstico Molecular.....	4
1.3.1. Genes canônicos da HF	4
1.3. Via do Receptor de LDL.....	5
1.4. Genes potencialmente associados à Hipercolesterolemia Familiar	7
1.4.1. Gene <i>APOE</i>	7
1.4.2. Gene <i>STAP1</i>	8
1.6. Tratamento da HF	10
1.7. Hipercolesterolemia Poligênica	10
1.8. Hipercolesterolemia Autossômica Recessiva	11
1.9. Sitosterolemia	11
1.9.1. Genes <i>ABCG5</i> e <i>ABCG8</i>	14

1.9.2.	Tratamento da Sitosterolemia.....	15
2.	Justificativa.....	16
3.	Objetivos	17
3.1.	Objetivo Geral.....	17
3.2.	Objetivos Específicos	17
4.	Métodos.....	18
4.1.	Seleção dos Pacientes	18
4.2.	Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	19
4.2.1.	ION Torrent PGM	19
4.2.2.	SureSelect QXT.....	19
4.3.	Metodologia de Sanger	19
4.4.	Análise bioinformática.....	20
4.5.	Análise de Variantes Genéticas	20
4.6.	Classificação das variantes genéticas dos genes <i>ABCG5/ABCG8</i> dos indivíduos do banco de dados UK Biobank	21
4.7.	Dosagem de Fitosteróis.....	22
4.8.	Análise Estatística.....	23
5.	Resultados	24
5.1.	Análise do gene <i>APOE</i>	26
5.2.	Análise do gene <i>STAP1</i>	29
5.3.	Análise dos genes <i>ABCG5</i> e <i>ABCG8</i>	31

6.	Discussão.....	40
6.1.	Gene <i>APOE</i>	40
6.2.	Gene <i>STAP1</i>	41
6.3.	Genes <i>ABCG5/8</i>	42
7.	Conclusões	46
8.	Sugestão para trabalhos futuros.....	47
9.	Anexos.....	48
9.1.	Anexo A.....	48
9.2.	Anexo B	49
9.1.	Anexo C	50
9.2.	Anexo D.....	39
9.3.	Anexo E	40
9.4.	Anexo F.....	41
9.5.	Anexo G.....	39
10.	Referências bibliografia	39
11.	Apêndices	46
11.1.	Apêndice A	46
11.1.	Apêndice B	52
12.1.	Apêndice C	57

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

°C	Graus Célsius
%	Porcentagem
β-Sitosterol	Beta-sitosterol
μL	Microlitro
mg/dL	Miligrama por decilitro
μg/mL	Micrograma por mililitro
mL	Mililitro
ABCG5	Gene que codifica o transportador de mesmo nome, responsável pelo tráfico de esterois no fígado e intestino
ABCG5/8	Genes <i>ABCG5</i> e <i>ABCG8</i>
ABCG8	Gene que codifica o transportador de mesmo nome, responsável pelo tráfico de esterois no fígado e intestino
ABraOM	Arquivo brasileiro online de mutações
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i> - Colégio Americano de Genética Médica e Genômica
APOB	Gene da apolipoproteína B
APOE	Gene da apolipoproteína E
AVC	Acidente vascular cerebral
CAPPesq	Comitê de ética para análise de Projeto de Pesquisa
CT	Colesterol total
DCV	Doença cardiovascular
DLCN	<i>Dutch Lipid Clinic Network Score</i> - Rede Clínica Holanda de Lipídios
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EVS	<i>Exome Variant Server</i> - Servidor de Variantes de Exoma
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i> - Consórcio de agregação de Exoma
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

GLGC	<i>Global Lipids Genetics Consortium</i> - Consórcio genômico lipídico global
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i> - Banco de dados de agregação de genoma
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> - Estudos de Associação Ampla do Genoma
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i> - Banco de dados de mutações genéticas humanas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMGCoA redutase	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IMC	Índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
Kaviar	<i>Known VARIants</i> - Variantes conhecidas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	LDL colesterol
LDLR	Gene do receptor de LDL
LDLRAP1	Gene da proteína adaptadora do receptor de LDL
LIPA	Gene da lipase ácida lisossomal
LoF	<i>Loss of function</i> - Perda de função
NGS	Sequenciamento de nova geração
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i> - Herança mendeliana online no homem
OMS	Organização mundial da saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase

<i>PCSK9</i>	Pró-proteína convertase subtilisina kexina tipo 9
<i>SNVs</i>	<i>Single nucleotide variants</i> - Variantes de nucleotídeo único
<i>STAP1</i>	Gene da proteína adaptadora 1 de transdução de sinal
<i>STSL</i>	Sitosterolemia
<i>TCLE</i>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>TG</i>	Triglicérides
<i>VLDL</i>	Lipoproteína de muito baixa densidade
<i>VUS</i>	<i>Variant of uncertain significance</i> - Variante de significado incerto

Lista de tabelas

Tabela 1 - Genótipos do gene <i>APOE</i>	8
Tabela 2 - Programa de bioinformática para predição de impacto na função da proteína estudada	21
Tabela 3 - Banco de dados de populações-controle	21
Tabela 4 - Bancos de dados de literatura médica	21
Tabela 5 - Características clínicas de todos os pacientes inclusos para análise....	25
Tabela 6 - Variantes encontradas no gene <i>APOE</i>	23
Tabela 7 - Variantes encontradas no gene <i>STAP1</i>	30
Tabela 8 - Características clínicas e bioquímicas dos pacientes STSL positivo x STSL/HF negativo	32
Tabela 9 - Descrição das variantes encontradas nos genes <i>ABCG5</i> e <i>ABCG8</i>	34
Tabela 10 - Características clínicas e bioquímicas de todos os homozigotos ou heterozigoto compostos	36

Lista de figuras

Figura 1 - As cinco principais causas de morte no mundo	2
Figura 2 - Representação da formação de placas de ateroma em artérias.....	3
Figura 3 - Representação da via do receptor de LDL	6
Figura 4 - Representação dos transportadores ABCG5/8 no transporte de esteróis.	13
Figura 5 - Fluxograma dos pacientes incluídos no programa Hipercol Brasil	26
Figura 6 - Heredograma das famílias A, B, C e D.	24
Figura 7 - Heredograma das famílias A, B e C.	30
Figura 8 – Resultado da análise molecular para rastreamento da Sitosterolemia .	33
Figura 9 - Heredograma das famílias A à H de Sitosterolemia.	37
Figura 10 - Sinais clínicos de alguns pacientes com STSL.	38

Resumo

Tada MT. *Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença autossômica dominante que resulta no aumento da concentração do colesterol total e LDL colesterol no plasma, aumentando o risco do desenvolvimento de doença cardiovascular em idade precoce. O diagnóstico de HF pode ser feito tanto de forma clínica quanto de forma genética. No diagnóstico genético, classicamente são sequenciados três genes: *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Entretanto, uma parcela dos pacientes sequenciados não possui uma causa genética identificada, podendo ser pela presença de outros genes que ainda não estão associados à HF, pela presença da hipercolesterolemia poligênica, assim como pela presença de fenocópias, como a Sitosterolemia (STSL). A STSL é uma doença autossômica recessiva causada pela disfunção dos transportadores *ABCG5/8*, o que resulta no acúmulo de fitosteróis na corrente sanguínea, podendo levar a hipercolesterolemia, que pode ser acompanhada pela presença de xantomas, assim como na HF. O presente estudo tem como objetivo caracterizar a prevalência e características clínicas da HF e da STSL através da análise dos genes *APOE*, *STAP1*, *ABCG5* e *ABCG8* em uma coorte hipercolesterolêmica participantes de um Programa Genético de Rastreamento em Cascata de Hipercolesterolemia Familiar. **Métodos:** Foram incluídos 505 casos-índice (CIs) para a análise de variantes raras no gene *APOE* e 265 CIs para a análise dos genes *APOE* e *STAP1* para HF e os genes *ABCG5/8* para investigação de STSL. **Resultados:** Foram identificados 10 CIs portadores de alterações de significância incerta (VUS) para HF, sendo 7 no gene *APOE* e 3 no gene *STAP1*. A STSL foi confirmada em 8 CIs, e o rastreamento genético nos seus familiares permitiu a identificação de 6 sitosterolêmicos adicionais.

Palavras-chave: hipercolesterolemia, fitosteróis, xantomatose, doença cardiovascular, hipercolesterolemia familiar

Abstract

Tada MT. *Analysis of STAP1, APOE, ABCG5 and ABCG8 genes in hypercholesterolemic patients with a negative molecular diagnosis for the LDLR, APOB and PCSK9 genes.* [Dissertation]. São Paulo: University of São Paulo Medical School, 2021.

Introduction: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disease that results in high plasma concentrations of total cholesterol and LDL cholesterol, increasing the risk of developing early cardiovascular disease. The FH diagnosis can be made both clinically and genetically. In genetic diagnosis, three genes are classically sequenced: *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9*. However, a portion of patients does not have an identified genetic cause, which may be due to the presence of variants in other genes, the presence of polygenic hypercholesterolemia, as well as, Sitosterolemia (STSL). STSL is an autosomal recessive disease caused by the dysfunction of *ABCG5/ABCG8* transporters, leading to the accumulation of phytosterols in the bloodstream, which may be accompanied by the presence of xanthomas, as well as in FH. The present study aims to characterize the prevalence and clinical features of FH and STSL through the analysis of the *APOE*, *STAP1*, *ABCG5*, and *ABCG8* genes in a hypercholesterolemic cohort participating in a familial hypercholesterolemia Cascade Screening Program. **Methods:** 505 index cases (ICs) were included for rare variants analysis in the *APOE* gene and 265 ICs for *APOE* and *STAP1* genes analysis for HF and *ABCG5/8* genes for investigation of STSL. **Results:** 10 ICs were identified carrying an uncertain significance variant (VUS) for HF, 7 in *APOE* gene, and 3 in *STAP1* gene. STSL was confirmed in 8 ICs, and genetic screening in their relatives led to the identification of 6 additional sitosterolemic patients.

Keywords: hypercholesterolemia, phytosterols, xanthomatosis, cardiovascular disease, familial hypercholesterolemia

1. Introdução

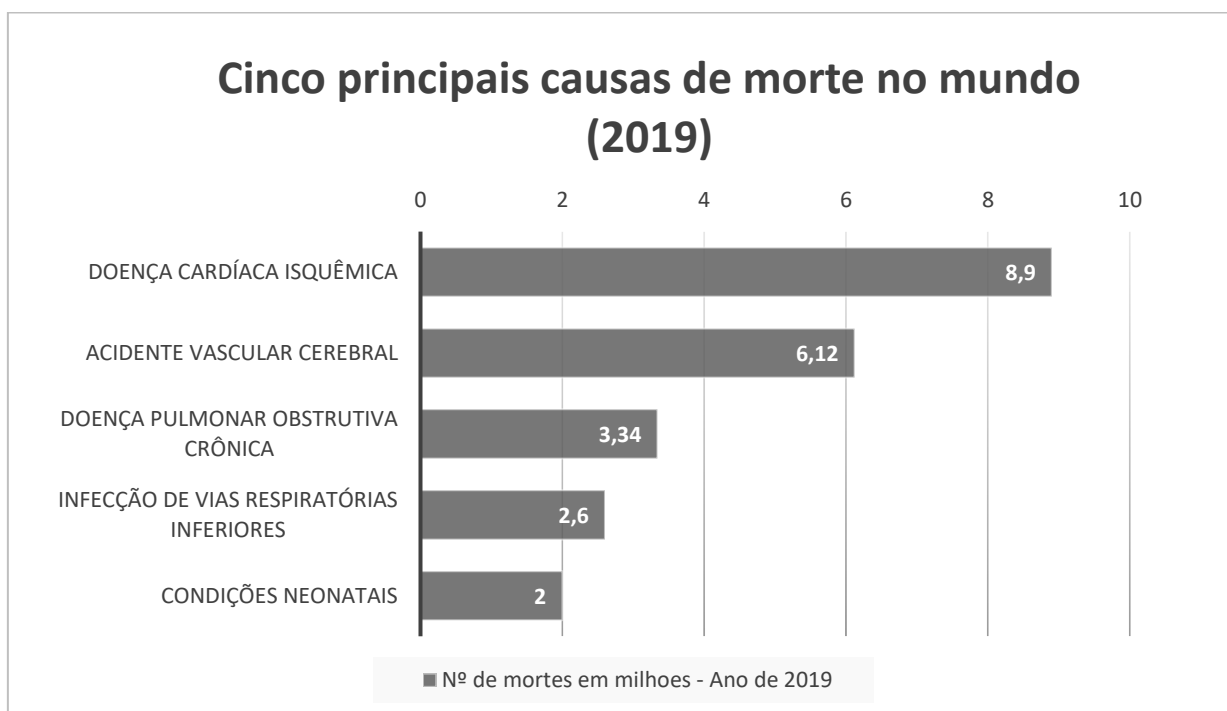
1.1. Hipercolesterolemia Familiar

A Hipercolesterolemia Familiar (HF; OMIM #143890) é uma doença autossômica dominante descrita inicialmente por Carl Müller, em 1938, como um “erro inato do metabolismo”. É uma doença que resulta no aumento plasmático do colesterol total (CT) e LDL colesterol (LDL-C), aumentando o risco do desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) em idade precoce (menos de 55 anos em homens e menos de 65 anos em mulheres)¹⁻³. Além do aumento plasmático do LDL-C, a presença de alguns sinais clínicos como arco corneano, xantoma e xantelasma podem estar associadas à esta desordem⁴.

A HF foi a primeira doença genética do metabolismo dos lipídios caracterizada de forma clínica e molecular, e é a forma monogênica mais comum de hipercolesterolemia na população⁵. Inicialmente a prevalência da HF foi estimada em 1:500 indivíduos na forma heterozigótica e 1:1.000.000 na forma homozigótica⁶, porém um estudo recente de revisão sistemática e meta-análise, no qual inclusive estavam incluídos estudo brasileiros, estimou que a prevalência da HF heterozigótica está em torno de 1:311 indivíduos e 1:390.000 na forma homozigótica^{7,8}.

O colesterol é encontrado naturalmente no corpo humano e é de fundamental importância para seu funcionamento, uma vez que participa no processo de formação de hormônios, vitaminas e ácidos biliares⁹. Pode ser adquirido pela alimentação, porém, a maior parte do colesterol circulante é devido à produção endógena do fígado¹⁰. O colesterol é transportado na corrente sanguínea através de partículas de lipoproteínas chamadas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL)¹¹.

O LDL-C exerce um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e da DCV. A doença cardiovascular é a principal causa de morte no mundo, sendo a doença cardíaca isquêmica a de maior importância. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2019, a doença cardíaca isquêmica representou 16% das mortes no mundo, seguida por acidente vascular cerebral (AVC) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), representando 11% e 6%, respectivamente (Figura 1)¹². O desenvolvimento da DCV ocorre devido a um processo denominado aterosclerose. A aterosclerose pode ser desencadeada por diversos fatores, como processos inflamatórios, agentes infecciosos, tabagismo, hipercolesterolemia ou pela combinação destes fatores.



Adaptado de Organização Mundial da Saúde (OMS), 2019

Figura 1 - As cinco principais causas de morte no mundo

Resumidamente, o colesterol em excesso presente na corrente sanguínea se adere ao endotélio vascular, e devido a uma disfunção deste, a partícula de LDL acaba por penetrar na parede endotelial. Este processo leva a uma série de complicações circulatórias decorrentes da resposta inflamatória e formação de uma placa fibrosa, onde acaba se projetando para o interior do lúmen, o que pode resultar em uma obstrução parcial ou total. Esta placa também

pode se desprender da parede endotelial e acabar obstruindo vasos de menor calibre, como as artérias coronárias, podendo levar a uma angina ou até mesmo ao infarto agudo do miocárdio (IAM; Figura 2)^{13,14}.



Fonte: Adaptado de Melbourne Health Care

Figura 2 - Representação da formação de placas de ateroma em artérias

Em pacientes HF não tratados, homens até os 50 anos de idade apresentam um risco de 51,4% de desenvolverem algum tipo de evento cardiovascular se não são tratados, enquanto em mulheres, esse risco é de 12%. Aos 60 anos, esse risco aumenta para 85,4% para os homens e 56,5% para as mulheres¹⁵. A presença de variante genética patogênica em genes relacionados à homeostase do LDL-C pode aumentar o risco do desenvolvimento de DCV de 2 a 3 vezes mais comparado a não-portadores e que possuem o mesmo nível de LDL-C. Isto pode ocorrer devido ao portador de alteração genética estar exposto a um valor de LDL-C elevado na corrente sanguínea por mais tempo, evidenciando a importância do diagnóstico precoce e tratamento adequado^{16,17}.

O tratamento através do uso de hipolipemiantes é efetivo e tem mostrado redução no desenvolvimento de DCV de forma precoce e aumento da sobrevida^{18,19}. Porém, a maior parte dos portadores de HF na maioria dos países são subdiagnosticados (<1%), e aqueles que tem diagnóstico, muitas vezes não são tratados adequadamente¹⁹. Existem algumas exceções como

a Holanda, que por meio do programa de rastreamento genético em cascata adotado por seu governo, permitiu a identificação de cerca de 71% dos portadores²⁰. A Organização Mundial da Saúde (OMS), assim como o Instituto Nacional de Excelência em Saúde e a Sociedade Européia de Aterosclerose reconhece o rastreamento genético em cascata como uma forma custo-efetiva para identificação desses pacientes^{5,21}.

1.2. Diagnóstico Clínico

Para o diagnóstico clínico podem ser levadas em consideração algumas informações como: valores de colesterol, presença de sinais clínicos como arco corneano, xantoma e xantelasma, histórico cardiovascular e histórico familiar²².

Existem três ferramentas principais utilizadas no diagnóstico: *US MedPed Program* (MedPed), *Simon Broome Register Group* e o *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN). O MedPed utiliza pontos de corte para os níveis de CT e LDL-C levando em consideração a idade e histórico familiar. Estes pontos de corte diferem para parentes de primeiro, segundo e terceiro grau. O *Simon Broome* leva em consideração os níveis de colesterol, presença de sinais clínicos, histórico familiar e diagnóstico molecular. Resulta em algumas classificações, como: definitivo ou provável. Já o DLCN é semelhante ao *Simon Broome*, porém, neste critério são atribuídos pontos para cada uma das atribuições, como níveis de colesterol, presença de sinais clínicos, histórico familiar e diagnóstico molecular. Ao final é gerado uma pontuação e uma classificação como “definitivo”, “provável” ou “possível”²².

1.3. Diagnóstico Molecular

1.3.1. Genes canônicos da HF

A HF é causada por variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em 3 genes principais: o gene do receptor de LDL (*LDLR*), o gene da apolipoproteína B-100 (*APOB*) e o gene da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (*PCSK9*). Cerca de 90% das

variantes patogênicas são encontradas no gene *LDLR*, 5-10% no gene *APOB* e 1-2% no gene *PCSK9*¹⁸.

O gene *LDLR* (NM_000527) está localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.1-p13.3)^{2,23}. Possui 18 exons codificantes, formando uma proteína com 860 resíduos de aminoácidos²⁴. Sua penetrância é completa, ou seja, 50% dos familiares de primeiro grau podem herdar variantes patogênicas neste gene, e todos aqueles que a herdarem também terão HF devido a sua penetrância¹⁷. Este gene codifica o receptor de LDL, uma glicoproteína de superfície de membrana que é responsável pela homeostase do colesterol através da endocitose^{2,25}. Foi descoberto em 1973 por Brown e Goldstein durante a sua pesquisa sobre a base molecular de HF²⁵.

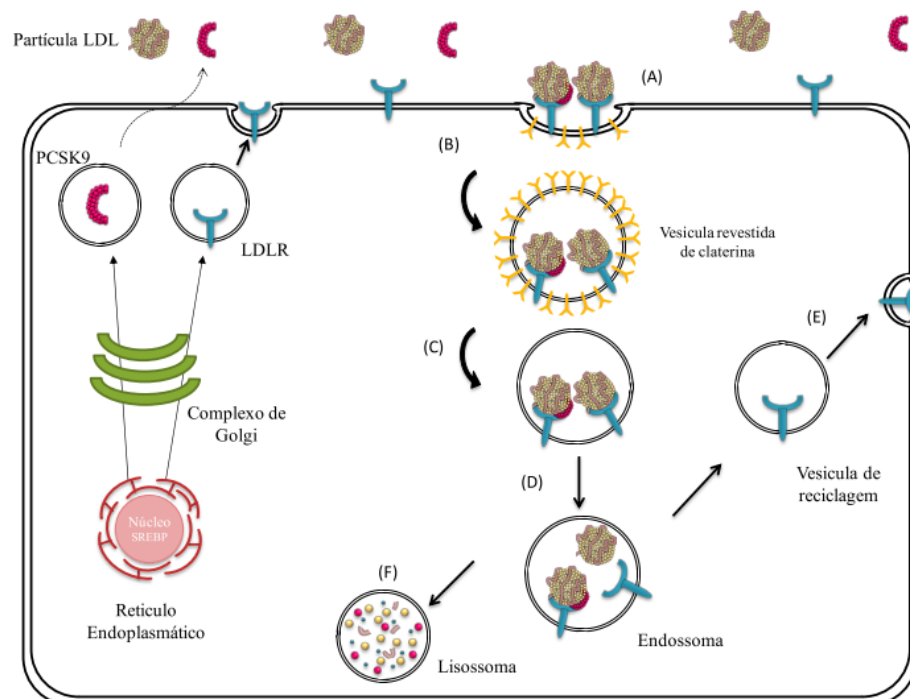
O gene *APOB* (NM_000384) está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p23-24)². Possui penetrância incompleta, composto por 29 exons codificantes, sendo que somente o exon 26 representa mais da metade da região codificante deste gene, tratando-se do exon mais longo já reportado^{24,26}. Variantes patogênicas no aminoácido 3527 são as mais comuns em algumas populações^{20,27}. Um exemplo é a alteração p.(Arg3527Gln), de origem holandesa e que nesta população está presente em 11% dos portadores de HF²⁸.

O gene *PCSK9* (NM_174936) está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p32) e é principalmente expresso no fígado, rim e intestino^{2,29}. As variantes patogênicas que estão relacionadas à HF são as de ganho de função, pois o PCSK9 ativa a via para a degradação do LDLR. Já as variantes que causam a perda de função, assim como variantes *nonsense*, estão relacionadas ao baixo LDL-C, pois o processo de degradação do LDLR é ineficiente^{21,30}.

1.3. Via do Receptor de LDL

As partículas de LDL são removidas da circulação através da ligação entre a proteína apoB-100 presente na superfície do LDL com o LDLR. O LDLR está presente em regiões que

são recobertas por clatrina na superfície interior da membrana celular, e quando há a formação do complexo LDL:LDLR, a membrana com clatrina forma invaginações para englobar este complexo, originando vesículas. Parte desse complexo internalizado apresentam a PCSK9 ligada à porção extracelular do LDLR, e na maioria dos tecidos é necessário a ligação da proteína adaptadora do receptor de LDL (LDLRAP1, produzida pelo gene de mesmo nome) na porção citoplasmática do LDLR para que ocorra a internalização desse complexo. Após a internalização ocorre a fusão dessa vesícula no citoplasma formando o endossoma, que por diminuição do pH dissocia o complexo LDL:LDLR. O receptor livre retorna à membrana celular para realizar um novo ciclo e as LDLs são degradadas em pequenos peptídeos, aminoácidos e colesterol livre. Já o complexo internalizado que possui a PCSK9 ligada, quando tem seu pH diminuído, tem sua afinidade de ligação com o LDLR aumentada, não permitindo que este complexo fique livre, induzindo sua degradação (Figura 3)¹⁴.



Fonte: Alves ACS, 2014

Figura 3 - Representação da via do receptor de LDL

1.4. Genes potencialmente associados à Hipercolesterolemia Familiar

Dependendo do critério de inclusão utilizado para o rastreamento genético de HF, a presença de alterações genéticas nos principais genes (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*) podem ser identificadas em cerca de 34-50% dos indivíduos, revelando que uma parcela dos pacientes com critério clínico para HF não possuem uma causa genética identificada^{18,31-34}. Isto pode ocorrer devido à presença de genes ainda não associados à doença, ou como também, a presença da hipercolesterolemia poligênica^{18,35}. Desta forma, recentemente houve a associação do gene *APOE* e *STAP1* com a HF, sugerindo que a presença de variantes genéticas raras nestes genes poderiam levar a hipercolesterolemia^{18,31,36}.

1.4.1. Gene *APOE*

O gene *APOE* (NM_000041) é um gene polimórfico que possui 3 alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) que se distinguem através da presença de cisteína e arginina nos aminoácidos 130 e 176³⁷, resultando em 6 genótipos possíveis: $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$ (Tabela 1). O alelo $\epsilon 2$ possui uma frequência alélica de 14,25% e está associado com a forma recessiva da hiperlipoproteinemia tipo III, enquanto que o alelo $\epsilon 4$ possui uma frequência alélica de 6,54% e está associado com o alto risco de DCV, assim como o desenvolvimento da doença de Alzheimer de início tardio². Já o alelo $\epsilon 3$ é considerado como isoforma referência e está presente na maioria da população. Considerando a frequência alélica de cada alelo, na população presente no GnomAD, as prevalências dos alelos são 0,9%, 75,9%, 14,3% e 2,0%, para os genótipos $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$ ³⁸. Este gene codifica a apolipoproteína E, uma proteína que é expressa em vários órgãos, como o fígado, cérebro, rim e baço. Está presente em todas as frações lipídicas, porém, em maior proporção no VLDL (de 10 a 20%) e no HDL (de 1 a 2%), e atua como mediador do receptor de LDL^{39,40}.

Tabela 1 - Genótipos do gene APOE

Genótipo	Aminoácido			
	130		176	
ε2	TGC	Cys	TGC	Cys
ε3	TGC	Cys	CGC	Arg
ε4	CGC	Arg	CGC	Arg

Cerca de $\frac{3}{4}$ do ApoE é produzido pelo fígado, e a deficiência desta proteína está ligada ao aumento do CT e triglicerídeos (TG). O gene *APOE* está relacionado à doença de Alzheimer, doenças cardíacas, hiperlipoproteinemia tipo III, entre outros³⁹.

Em 2013, Marduel *et al* realizaram um estudo em uma família francesa que possuía 14 membros com diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar. Nesta família foi feito o sequenciamento dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* e não foram encontradas nenhuma variante que pudesse estar associada com a hipercolesterolemia. Um estudo mais detalhado permitiu encontrar uma variante no gene *APOE*, uma deleção de um aminoácido na posição 167, tendo assim, uma leucina eliminada, p.(Leu167del). Awan *et al* realizaram um estudo neste mesmo ano e também encontraram esta variante em um paciente com fenótipo de HF. Recentemente, em 2016, Cenarro *et al* realizaram um estudo para determinar a frequência desta mesma variante em pacientes portadores de HF, no qual foi feito o sequenciamento de 288 pacientes e encontraram 9 pacientes portadores desta alteração em heterozigose. Destes, todos os familiares foram convocados para participar do estudo. Foram identificados 10 familiares portadores desta variante, sendo que seis apresentaram hipercolesterolemia isolada, enquanto três apresentaram hiperlipidemia mista e somente um não possuía colesterol acima do valor de referência⁴¹.

1.4.2. Gene *STAP1*

O gene *STAP1* (NM_012108) foi o último gene associado à HF, descrita por Fouchier e sua equipe em 2014³¹. A proteína 1 do adaptador de transdutor de sinal é codificado pelo gene *STAP1*, que possui 9 exons codificantes, e está localizado no cromossomo 4²⁴. Este gene é

expresso principalmente em linfócitos e pouco expresso no fígado, tendo uma expressão temporária ou até limitado neste órgão. A função do *STAP1* na homeostase do colesterol ainda é desconhecida, porém a sua participação pode se dar por meio da interação com proteínas de membrana, uma vez que a sua estrutura apresenta vários sítios de fosforilação de tirosina. É importante salientar também que as variantes *missense* neste gene foram encontradas em pacientes com carcinoma hepático, sugerindo que o gene pode ter um papel importante neste órgão^{42,43}.

Através da análise paramétrica de *linkage*, Fouchier e sua equipe conseguiram identificar uma região cromossômica que estaria ligada ao fenótipo de HF em uma família com diagnóstico molecular negativo para os genes canônicos da HF. Foi realizado o sequenciamento de exoma e encontrado a variante p.(Glu97Asp), considerada deletéria e extremamente rara, sugerindo que não se tratava de um polimorfismo. Através da co-segregação familiar, foi visto que a penetrância dessa variante chegou a 0,94, ou seja, de 16 portadores, somente 1 não possuía o nível colesterol acima da média. Devido à presença desta variante, foi realizado o sequenciamento de toda região codificante do gene *STAP1* em 400 pacientes com diagnóstico molecular negativo para os genes canônicos da HF, e conseguiram encontrar mais 2 portadores da p.(Glu97Asp), assim como outras três variantes: p.(Leu69Ser) (c.206T>C), p.(Ile71Thr) (c.212T>C) e p.(Asp207Asn) (c.619G>A). As duas primeiras estão localizadas no exon 3, e a última está localizada no exon 6, e todas essas variantes estão presentes em sítios conservados. O rastreamento realizado em 400 indivíduos resultou na identificação de 5 variantes, tendo assim uma frequência de 1,3%. Através da co-segregação familiar foi visto que os portadores (45 indivíduos) destas variantes possuíam valores de LDL-C mais altos comparando com não-portadores (91 indivíduos) ($p < 0,05$)³¹.

Segundo Fouchier (2014), portadores de alterações patogênicas no gene *STAP1* possuem fenótipo um pouco mais brando quando comparado aos portadores que tem

alterações no *APOB*, e estes são mais brandos do que portadores de alterações no gene *LDLR*. Outro ponto observado foi que portadores de alterações no gene *STAP1* possuem níveis de triglicerídeos um pouco mais elevado que os portadores de alterações no gene *LDLR* ou *APOB*⁴⁴.

1.6. Tratamento da HF

A mudança no estilo de vida como ter uma dieta saudável, IMC adequado, não ser tabagista e realizar atividade física de forma regular são aspectos importantes no manejo de pacientes com HF, pois ajudam na redução dos valores de colesterol, assim como reduz também o risco do desenvolvimento de DAC. Pacientes com HF necessitam reduzir seu valor de LDL-C em cerca de 40%, e para atingirem este objetivo, a inclusão de fármacos hipolipemiantes acaba sendo necessária para a maioria deles. Em geral, utilizam-se de hipolipemiantes como estatinas, resinas, ezetimiba ou a sua combinação, e em casos mais severos, a LDL-aférese pode ser indicada⁴⁵.

1.7. Hipercolesterolemia Poligênica

Através de estudos de associação genômica (GWAS – do inglês *Genome-wide association studies*) foi possível identificar centenas de polimorfismos de nucleotídeo único (SNVs) que estão associados ao aumento do nível de LDL-C. O efeito da presença de somente um único SNV não possui poder suficiente para elevar os níveis de LDL-C ao nível de um portador de HF. Porém, a soma de diversos SNVs, cada um contribuindo com uma parcela na elevação do nível de LDL-C, pode resultar em uma hipercolesterolemia. Estima-se que a hipercolesterolemia poligênica possa representar em torno de 15% dos casos em que uma causa monogênica foi não foi identificada³⁵. Para testar esta hipótese, Talmud *et al* selecionaram 12 SNVs que possuíam maior peso na elevação do nível de LDL-C reportados pelo *Global Lipid Genomic Consortium* (GLGC), para o cálculo do escore genético. Este escore foi calculado em um grupo de pacientes que possuíam diagnóstico clínico de HF e em

um grupo controle. Foi observado que a média do escore em pacientes que possuíam alteração monogênica identificada era maior que nos controles. Nos que não tiveram uma alteração monogênica identificada, a média do escore era ainda maior, sugerindo que o escore poligênico pode ter uma atribuição importante na hipercolesterolemia⁴⁶. Futema *et al* fizeram um refinamento deste estudo para melhorar o desempenho do escore poligênico, adicionando e retirando variantes para o cálculo final do escore, e assim concluíram que a redução de 12 SNVs para 6 não afetava significativamente no cálculo do escore genético, e salientaram que a redução da quantidade de SNVs seria mais prático e vantajoso financeiramente⁴⁷. No entanto, o escore utilizando-se de 12 ou 6 SNVs foi validado para a população europeia e ainda não foi validada para a população brasileira.

1.8. Hipercolesterolemia Autossômica Recessiva

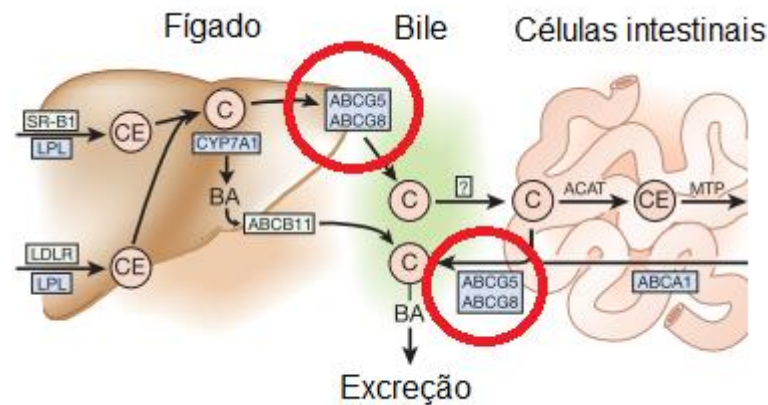
A presença de variantes patogênicas em homozigose ou heterozigose composta no gene *LDLRAP1* (NM_015627) leva à Hipercolesterolemia Autossômica Recessiva (OMIM #603813)⁴⁸. É uma forma muito mais rara de Hipercolesterolemia Familiar, porém, de herança recessiva. O fenótipo produzido por alterações neste gene leva a um quadro clínico semelhante à HF homozigótica, entretanto, podendo ser menos severa e de melhor resposta ao uso de hipolipemiantes⁴⁹. A proteína 1 do adaptador de LDL produzida pelo gene *LDLRAP1* interage com o receptor de LDL durante o processo de internalização do LDL-C por endocitose, e sua deficiência leva à hipercolesterolemia^{17,48}. Até o presente momento, somente foram reportadas 17 variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas no banco de dados ClinVar⁵⁰.

1.9. Sitosterolemia

A Sitosterolemia (STSL; OMIM #210250/#618666) é uma doença autossômica recessiva descrita inicialmente por Bhattacharyya e Connor em 1974. É caracterizada pelo aumento dos níveis de esteróis vegetais na corrente sanguínea, onde muitas vezes está

associada à presença de hipercolesterolemia, xantomas e aterosclerose prematura⁵¹⁻⁵³. Outros sinais clínicos podem estar presentes, como a presença de alterações hematológicas e anemia. Dentre as alterações hematológicas está a presença de estomatócitos, trombocitopenia e macrotrombocitopenia. Estas alterações hematológicas podem estar presentes devido a incorporação de fitosteróis pelas hemácias e plaquetas, levando a sua disfunção e alteração da morfologia⁵⁴⁻⁵⁶. Alguns pacientes portadores de STSL podem apresentar somente alterações hematológicas, sinais mais discretos que podem passar despercebido, sugerindo que a frequência desta doença possa ser ainda maior⁵⁷. Portanto, portadores da STSL podem apresentar heterogeneidade fenotípica, podendo ser encontrado desde pacientes normocolesterolêmicos até hipercolesterolêmicos associado à presença de xantomas^{57,58}. O acúmulo de colesterol e fitosterol na corrente sanguínea pode levar à formação de xantomas e aterosclerose prematura, podendo resultar em IAM e morte súbita^{52,54}.

É causada por variantes em homozigose ou heterozigose composta nos genes *ABCG5* ou *ABCG8*. Normalmente, menos de 5% dos esteróis vegetais ingeridos são absorvidos, porém, em pacientes com Sitosterolemia essa taxa é de 50%, podendo apresentar uma concentração de 30 a 50 vezes maior que um não-sitosterolêmico. Os principais fitosteróis encontrados são: sitosterol, campesterol e estigmasterol; e o aumento destes é causado pelo aumento da absorção intestinal e redução da excreção biliar (Figura 4)^{41,57,59-61}.



Adaptado de Repa e Mangelsdorf (2002)⁶²

Figura 4 - Representação dos transportadores ABCG5/8 no transporte de esteróis.

Os transportadores ABCG5/8 presentes no fígado fazem o transporte de esteróis para a excreção via bile, assim como o transporte reverso dos enterócitos de volta para o lúmen intestinal para excreção

Na rotina de laboratório a dosagem do colesterol é feita pelo método enzimático colorimétrico, onde não é possível distinguir o colesterol do fitosterol, pois este método depende da reação com a dupla-ligação do carbono-5 ou pela presença do grupo 3-beta-hidroxil, estruturas presente em ambos esteróis. Assim, para distinguir entre os esteróis é necessário utilizar metodologias mais específicas como a cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ou cromatografia líquida de alta pressão⁵⁷.

Atualmente, foram identificados pouco mais de 100 portadores de STSL no mundo, sendo assim, uma doença extremamente rara. Tada *et al* estimaram a prevalência da STSL baseando-se na presença de variantes heterozigóticas de perda de função (*Loss of function, LoF*) no banco de dados *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), concluindo que a prevalência da STSL poderia estar em torno de 1:200.000 indivíduos^{57,63}.

Até o presente momento, não existem casos no Brasil de STSL reportados na literatura médica que relacionem a clínica com a genética, e na América Latina há somente um único caso reportado no México, evidenciando que esta condição é desconhecida não somente no Brasil, mas quase todos os países da América Latina⁶⁴.

Atualmente, um dos principais critérios utilizados para diagnóstico de STSL é ter o β -sitosterol $\geq 10 \mu\text{g/mL}$. Porém, um estudo realizado no Japão, que incluía pacientes positivos para dupla-mutação (homozigoto ou heterozigotos composto), portadores (heterozigoto) e não-portadores (ausência de alteração), identificou que o valor de β -sitosterol apresentava um valor preditivo positivo maior quando adotado um valor de $15 \mu\text{g/mL}$ para o diagnóstico de STSL⁶⁵.

1.9.1. Genes *ABCG5* e *ABCG8*

Os transportadores ABC estão relacionados à doença cardiovascular devido ao seu papel na homeostase do colesterol. Eles são divididos em 7 subfamílias, de A a G, composto por proteínas monoméricas e diméricas, e também estão associados a outras funções como regulação da pressão arterial, função endotelial, inflamação vascular e produção e agregação de plaquetas^{59,66}.

Os genes *ABCG5* (NM_022436) e *ABCG8* (NM_022437) foram associados à STSL através de um estudo realizado por Berge *et al* na tentativa de fazerem a caracterização da estrutura destes transportadores^{59,66}. Estes genes estão localizados lado a lado no cromossomo 2, ambos possuindo 13 exons codificantes cada. Cada gene codifica metade do transportador, que juntos formam um heterodímero que é responsável pelo tráfico de esterol no fígado e intestino, locais onde são mais expressos^{29,66,67}. Este transportador é produzido no retículo endoplasmático, é maturado no complexo de Golgi e está presente na membrana apical dos enterócitos e na membrana canalicular dos hepatócitos⁶⁸. A perda de função desta proteína impede o efluxo do colesterol pelos hepatócitos e enterócitos para a excreção biliar, aumentando a absorção intestinal e reduzindo a excreção via bile^{29,66,67}.

1.9.2. Tratamento da Sitosterolemia

As estatinas utilizadas como primeira linha na cardiologia preventiva atua na inibição da HMG-CoA redutase, enzima que atua na via metabólica para produção endógena do colesterol, e é baseada em diversos estudos com evidência clínica de eficácia e segurança. Porém, mesmo utilizando a dosagem máxima de estatinas em alguns pacientes, não é possível atingir uma redução adequada, necessitando a introdução de outras terapias medicamentosas. Dentre essas terapias, a ezetimiba tem se mostrado uma grande aliada às estatinas devido a inibição da NPC1L1, e consequentemente, inibição da absorção de colesterol dependente deste transportador⁶⁹.

Um estudo realizado por Tada *et al* (2020) concluíram que a combinação atorvastatina-ezetimiba em pacientes com variante genética patogênica identificada nos genes *ABCG5/8*, apresentaram melhores resultados quando comparado àqueles sem alteração, mostrando a importância da introdução da ezetimiba nesses pacientes⁶⁹.

2. Justificativa

A HF é a doença genética mais frequente na população, porém, mais da metade daqueles que são submetidos a um rastreamento genético não possuem uma causa monogênica identificada. Isto pode ser devido a presença de variantes em genes que ainda não estão associados à doença, assim como também pode ser devido à hipercolesterolemia poligênica. Portadores de HF podem apresentar hipercolesterolemia desde a infância, aumentando assim o risco de aterosclerose prematura, podendo levar a complicações cardiovasculares como o IAM. Entretanto, esta doença possui fenocópias, onde o quadro clínico pode ser semelhante à HF, como no caso da Sitosterolemia. Nesta doença, devido à heterogeneidade fenotípica, o quadro clínico pode ser bastante semelhante à HF, apresentando hipercolesterolemia acompanhada da presença de xantomias⁶⁷. Porém, esta doença é de herança recessiva e pode estar presente em famílias nas quais não há histórico familiar de doença cardiovascular. Apesar de ambas as doenças poderem apresentar um quadro clínico semelhante, o diagnóstico diferencial entre elas deve ser realizado, uma vez que o tratamento pode ser melhor direcionado e o risco do desenvolvimento de complicações cardiovasculares reduzido. Estudos demonstraram que pacientes portadores de STSL não respondem tão bem ao uso de estatinas quanto portadores de HF, e que o uso de ezetimiba na STSL têm se mostrado eficiente. Além disso, a alimentação é outro fator muito importante em ambas as doenças, porém, na STSL, a ingestão de esteróis vegetais deve ser restringida^{52,57,59,67}.

No Brasil, a investigação sobre a base molecular da HF vem ganhando força nos últimos anos, apresentando cerca de 50% das publicações sobre HF somente nos últimos quatro anos. Já com relação à STSL, a escassez de estudos onde é avaliado a parte clínica e genética são escassas não só no Brasil, como no mundo. A investigação de novos genes relacionados à HF, assim como o rastreamento da STSL em pacientes hipercolesterolêmicos

pode ajudar a caracterizar a base molecular de ambas as doenças na população brasileira, bem como contribuir para a melhora do prognóstico dos portadores.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Analisar os genes *STAP1* e *APOE* para a investigação de variantes genéticas que possam estar relacionadas à Hipercolesterolemia Familiar e analisar os genes *ABCG5* e *ABCG8* como diagnóstico diferencial para Sitosterolemia.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se as alterações encontradas estão descritas na literatura médica e se possuem relação com a Hipercolesterolemia Familiar.

- Investigar se pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para HF possuem Sitosterolemia, pesquisa feita por meio de investigação de variantes patogênicas nos genes *ABCG5* e *ABCG8*.

- Avaliar a frequência das variantes encontradas através da comparação com populações controles disponíveis.

- Avaliar a predição do efeito de variantes provavelmente patogênicas na estrutura e função de proteínas, assim como avaliar a conservação entre as espécies utilizando programa de bioinformática.

- Realizar co-segregação familiar de variantes provavelmente patogênicas através do sequenciamento dos familiares pela metodologia de Sanger.

4. Métodos

4.1. Seleção dos Pacientes

Para a realização deste estudo foi analisado o gene *APOE* de 505 CIs que possuem diagnóstico molecular negativo para os genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Foi investigado se as variantes genéticas encontradas poderiam estar relacionadas à HF. Estes pacientes foram sequenciados através da metodologia IonTorrent PGM® entre outubro/2015 a outubro/2017.

Também foram analisados os genes *APOE*, *STAP1*, *ABCG5* e *ABCG8* em 265 pacientes não relacionados e que possuem diagnóstico molecular negativo para os genes canônicos (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*). Os pacientes foram sequenciados a partir de outubro/2017 através da plataforma Illumina utilizando o sequenciador MiSeq.

O critério de seleção utilizado foi possuir valor de LDL-C ≥ 210 mg/dL. Os critérios de exclusão utilizados foram: triglicérides ≥ 400 mg/dL, insuficiência hepática ou renal, hipotireoidismo descompensado ou pacientes HIV positivos.

O material biológico de todos os pacientes foi captado através do programa de rastreamento genético em cascata de Hipercolesterolemia Familiar – Hipercol Brasil, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração de São Paulo – após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; Apêndice A). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa institucional (CAPPesq number 3757/12/013; Apêndice B). O Hipercol Brasil é o maior programa de rastreamento genético em cascata da América Latina e está desde 2012 realizando a identificação de indivíduos com HF de forma genética. Sua coorte já compreende mais de 2 mil indivíduos com alteração genética identificada⁷⁰.

4.2. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

4.2.1. ION Torrent PGM

Os CIs para análise do gene *APOE* foram sequenciados através do ION Torrent PGM (Thermo Fisher) utilizando painel customizado contendo os genes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *APOE* e *LIPA*. Esta metodologia é baseada em sequenciamento por síntese, utilizando-se de semicondutores para avaliação da variação de pH através da incorporação de nucleotídeos durante o processo de sequenciamento. Foi utilizado o protocolo de preparo de biblioteca e de carregamento seguindo as recomendações estabelecidas pelo fabricante.

4.2.2. SureSelect QXT

Com o intuito de atualizar o painel genético, foi decidido realizar a inclusão de novos genes assim como realizar a troca da metodologia de sequenciamento. Para preparo de biblioteca foi utilizado a tecnologia SureSelect QXT (Agilent Technologies) e o sequenciador da plataforma Illumina (MiSeq). O sequenciamento desta metodologia é baseado em síntese, utilizando sondas para a captura das regiões de interesse. Os genes que compõem este painel são: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *APOE*, *ABCG5*, *ABCG8* e *STAP1*. O preparo de biblioteca e o carregamento foram feitas seguindo as recomendações estabelecidas pelos fabricantes.

4.3. Metodologia de Sanger

As amostras de DNA dos familiares foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se de *primers* específicos para a região de interesse. Os primers utilizados foram desenhados no programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Ao final do processo de amplificação, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmação da amplificação. Logo após foi realizado a purificação utilizando-se da enzima ExoSAP-IT e em seguida realizado a reação de sequenciamento utilizando-se do *Big*

Dye. As amostras então foram precipitadas e sequenciadas através do sequenciador AB3500XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystem). O arquivo gerado pelo sequenciador foi analisado através do programa Geneious 9.0.2 para avaliação da presença ou não de variante genética.

A metodologia de Sanger também foi utilizada para a confirmação de variantes genéticas de baixa frequência, baixa cobertura, ou quando fosse necessária a confirmação da presença da variante encontrada no NGS.

4.4. Análise bioinformática

O arquivo bruto gerado pelo servidor do sequenciador Ion Torrent PGM e MiSeq foi analisado através do programa CLC Genomics Workbench 9.0 (QIAGEN) de acordo com *workflow* previamente estabelecido pelo programa Hipercol Brasil.

4.5. Análise de Variantes Genéticas

As variantes genéticas encontradas foram avaliadas através de programa de bioinformática para prever se a presença da variante genética pode alterar a estrutura/função da proteína estudada. Os programas utilizados para avaliação da predição de impacto estão descritos na Tabela 2. A comparação da presença da variante em populações-controle utilizada está descrita na Tabela 3. As variantes encontradas foram pesquisadas nos bancos de dados descritos na Tabela 4. Todas as variantes foram classificadas de acordo com as recomendações do *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*⁷¹.

Tabela 2 - Programa de bioinformática para predição de impacto na função da proteína estudada

Polyphen-2	Prevê o possível impacto de uma substituição de aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana usando considerações físicas e comparativas diretas
Provean / Mutation Taster	Prevê se a substituição de um aminoácido possui impacto na função biológica da proteína
Sift	Prevê se a substituição de um aminoácido afeta a função da proteína; previsão baseada através do alinhamento de sequências relacionadas para comparação da conservação do aminoácido

Tabela 3 - Banco de dados de populações-controle

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações: Exoma de 609 idosos da cidade de São Paulo com idade média de 73 anos
EVS	<i>Exome Variant Server</i> : Possui exoma de 6503 indivíduos, sendo composta por 2203 afro-americanos e 4300 europeu-americanos
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i> : Compilação de diversos projetos de sequenciamento de larga-escala. Possui 60706 exomas
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i> : Compilação de diversos projetos de sequenciamento de larga-escala. Possui 123 mil exomas e 15 mil genomas
Kaviar	<i>Known VARIants</i> : Compilação de 25 projetos de sequenciamento de larga-escala. Possui 13 mil genomas e 65 mil exomas

Tabela 4 - Bancos de dados de literatura médica

ClinVar	Banco de dados que possui informe sobre a relação da presença de variantes genéticas com o fenótipo, através de evidência de apoio
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i> : Banco de dados de variantes genéticas causadoras de doenças, que estão associadas ou que são polimorfismos funcionais

4.6. Classificação das variantes genéticas dos genes *ABCG5/ABCG8* dos indivíduos do banco de dados UK Biobank

Para a comparação da frequência de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas com a coorte de hipercolesterolêmicos do Hipercol Brasil, foi realizado a análise de variantes raras nos genes *ABCG5/ABCG8* do UK Biobank (2ª versão, de outubro de 2020), banco de dados biomédico prospectivo de larga escala, composto por 200.643 sequenciamento completo de exoma (WES) de indivíduos matriculados, com idade entre 40 e 69 anos de idade no momento do recrutamento.

O WES foi realizado pelo *Regeneron Genetics Center*. Em resumo, as sequências (reads) foram alinhadas ao genoma humano de referência (versão GRCh38) usando o BWA-MEM; os *reads* duplicados foram marcados usando a ferramenta Picard, e os arquivos de chamada de variante genômica (gVCF) foram gerados usando o chamador de variante WeCall. Após a aprovação do acesso aos dados (UK Biobank Project 14654), os dados WES foram baixados para um computador local, anotados e filtrados para um MAF < 0,0001. As variantes foram ainda filtradas para conter apenas variantes de LoF. Assim, todas as variantes foram filtradas para os genes *ABCG5* ou *ABCG8* e cruzadas com o banco de dados ClinVar em 21/07/2021.

4.7. Dosagem de Fitosteróis

Os fitosteróis (sitosterol e campesterol) foram dosados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). Resumidamente, o soro foi hidrolisado em solução etanólica de KOH contendo 5 α -colestano como padrão interno e extraído com hexano. Um microlitro da amostra foi injetado no GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, Kyoto, Japão). A separação eficiente dos esteróis foi realizada em uma coluna capilar Restek de 30 m de comprimento (100% dimetil polissiloxano-Rxi13323) com um diâmetro interno de 0,25 mm, ao qual continha hélio como fase móvel e tinha uma velocidade linear constante de 45,8 cm/s com uma temperatura de forno mantida a 260°C. O espectrômetro de massa operou no modo de impacto de elétrons a uma voltagem de ionização de 70 eV com uma temperatura de fonte de 300°C para os íons e a interface. Os íons dos fitosteróis foram identificados no espectrômetro de massa usando monitoramento de íon único. A quantificação foi feita comparando as áreas dos picos e os espectros de massa da curva de íons padrão após correção do padrão interno⁷². Para comparação, foi utilizado um pool como controle, ao qual continha

amostras mistas de 6 indivíduos saudáveis sem hipercolesterolemia ou qualquer outra doença conhecida.

4.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 20.0). Inicialmente foi feito uma análise descritiva das variáveis. Para variáveis contínuas não-paramétricas, as medianas e o primeiro e terceiro quartis foram calculados, e a diferença entre as medianas foi comparada utilizando o teste de Mann-Whitney U. Variáveis categóricas foram calculadas como frequências, e a diferença entre as frequências foram feitas por meio do teste de Chi-quadrado. Foi considerado como significância estatística um valor de $p < 0,05$. A comparação da concentração de esteróis entre os grupos foi realizada através do teste Kruskal Wallis, e a diferença entre os pares foi realizada através do teste Mann-Whitney U considerando o ajuste de Bonferroni, sendo significativo um valor de $p < 0,016$.

5. Resultados

Foi realizado a análise do gene *APOE* de 770 CIs, sendo 505 provenientes da metodologia ION Torrent e 265 provenientes da metodologia Illumina. Os CIs sequenciados pela metodologia Illumina também tiveram a análise dos genes *STAP1*, *ABCG5* e *ABCG8* realizada. As características clínicas de todos os CIs estão representadas na Tabela 5.

Os 265 CIs provenientes da metodologia Illumina tiveram uma análise inicial partindo de 443 CIs que foram inclusos para sequenciamento de painel genético para HF, pesquisa feita através da análise dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Também foi realizado o sequenciamento dos genes *LIPA* e *LDLRAP1*, genes associados à deficiência da lipase ácida lisossomal e HF recessiva, respectivamente. Dentre os 443 CIs, 14 foram incluídos devido à suspeita de STSL, sendo assim, para a análise dos genes *ABCG5/8*. Estes CIs foram previamente sequenciados pela plataforma ION Torrent e não tiveram variante genética identificada para HF. Porém, devido apresentarem características clínicas de STSL, optou-se por inseri-los em novo painel para análise dos genes de STSL. O critério utilizado para a seleção destes pacientes foram: LDL-C \geq 300 mg/dL, presença de xantomas ou drástica redução dos níveis de LDL-C através de dieta ou pelo uso da ezetimiba. Esta primeira etapa do sequenciamento resultou na identificação de 147 CIs com alteração patogênica ou provavelmente patogênica para HF nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*, e 31 CIs portadores de variantes VUS nos genes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* e *LDLRAP1*. Sendo assim, restaram 265 CIs para análise dos genes *APOE*, *STAP1*, *ABCG5* e *ABCG8* (Figura 5).

Tabela 5 - Características clínicas de todos os pacientes incluídos para análise

Variáveis	CI's n = 770
Idade (anos)	52,8 (38,0-61,2)
Sexo	
Feminino (%)	514 (66,8)
Masculino (%)	256 (33,2)
Raça autodeclarada	
Branco (%)	385 (67,4)
Pardos (%)	116 (20,3)
Pretos (%)	57 (10,0)
Outros ou não-declarados (%)	13 (2,3)
Exames bioquímicos	
CT basal* (mg/dL)	323,0 (301,0-352,0)
LDL basal* (mg/dL)	236,0 (217,0-258,0)
HDL basal* (mg/dL)	52,0 (43,0-65,0)
TG basal* (mg/dL)	152,0 (109,0-230,0)
CT atual (mg/dL)	310,0 (261,0-372,0)
LDL atual (mg/dL)	227,0 (181,0-271,0)
HDL atual (mg/dL)	54,0 (45,0-71,5)
TG atual (mg/dL)	164,0 (107,0-296,0)
Exame físico	
Xantasma (%)	52 (7,1)
Xantoma (%)	21 (2,9)
Arco corneano (%)	50 (6,9)
Histórico médico	
Em tratamento (%)	507 (68,4)
Hipertensão (%)	289 (49,1)
Diabetes (%)	108 (18,1)
Tabagismo (%)	260 (39,9)
IMC (kg/m ²)	26,6 (23,5)
DCV precoce (%)	139 (20,0)
Histórico familiar de DCV (%)	356 (54,1)
Crianças (%)	47 (17,7)

*Valor de colesterol sem tratamento ou maior valor de colesterol sob tratamento. DCV precoce: homens < 55 anos e mulheres < 65 anos. Variáveis quantitativas estão expressas em medianas (1º e 3º quartis). Variáveis categóricas estão expressas em valores absolutos e porcentagens. O histórico médico de crianças somente teve o valor de IMC avaliado.

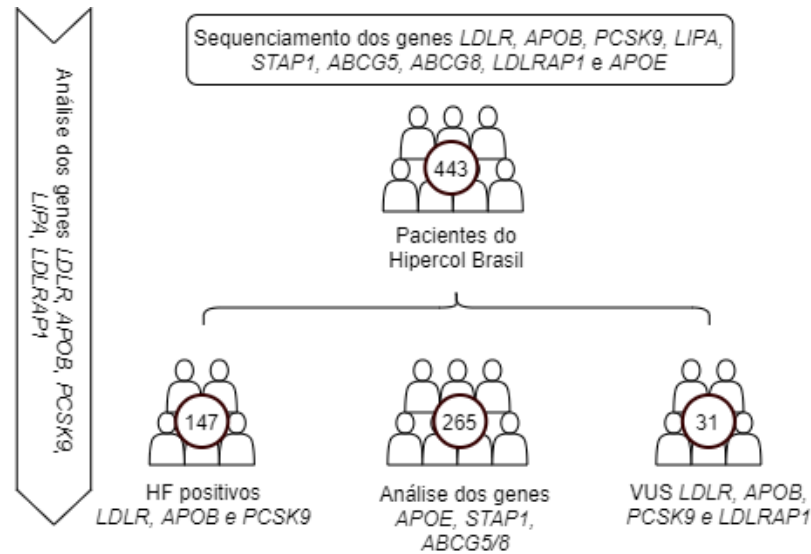


Figura 5 - Fluxograma dos pacientes incluídos no programa Hipercol Brasil

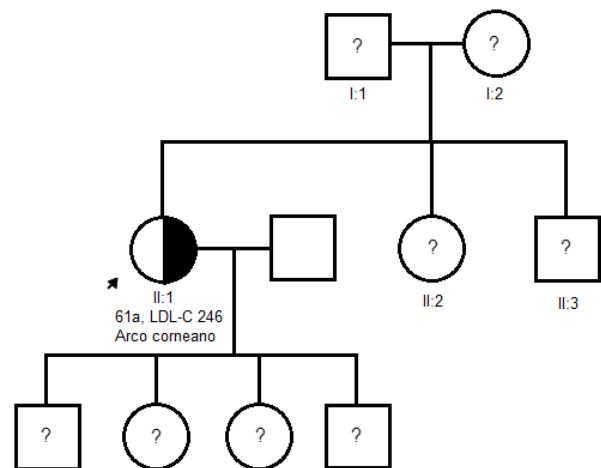
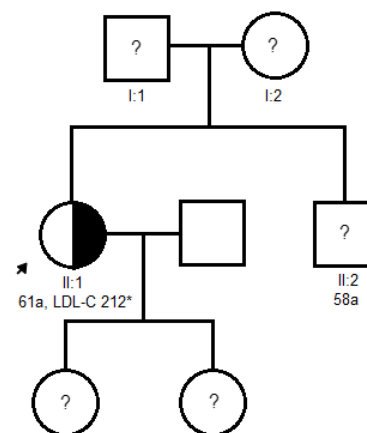
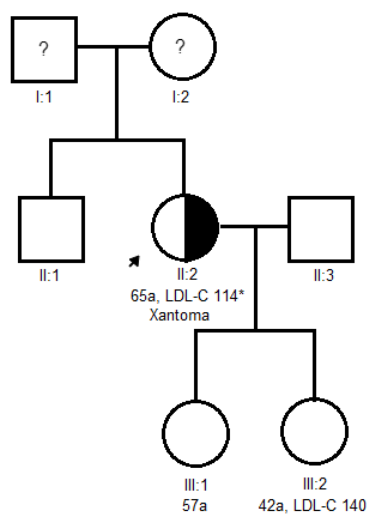
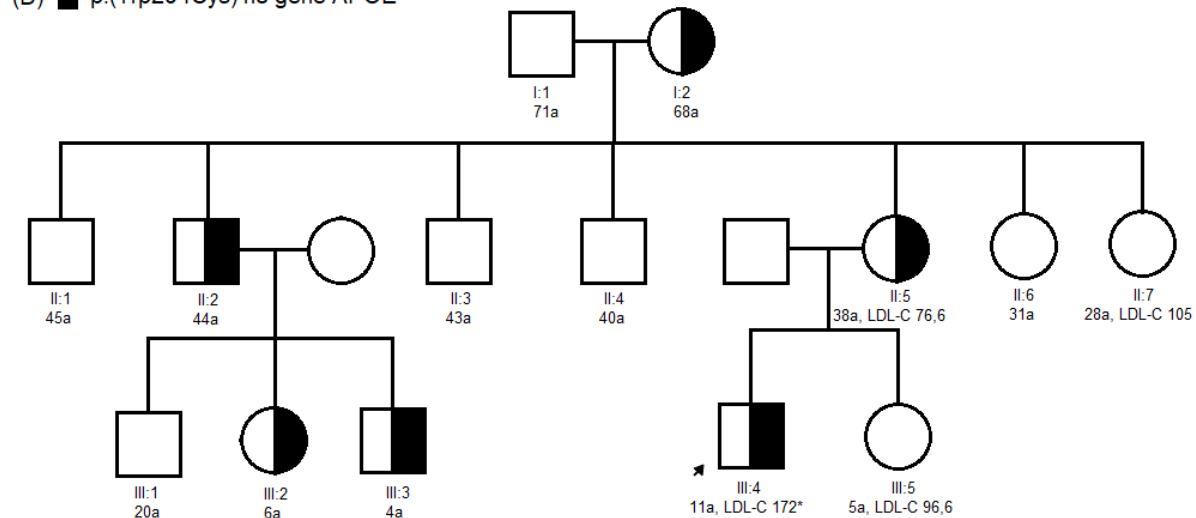
5.1. Análise do gene *APOE*

Dentre os 770 CIs incluídos para análise, 7 CIs (0,91%) foram identificados sendo portadores de variante VUS no gene *APOE*. Ao total, foram identificadas 6 variantes, tendo apenas uma sido encontrada em dois pacientes. As variantes estão descritas na Tabela 6. Os heredogramas das famílias estão representados na Figura 6. Todas as variantes são raras ou ausentes nos bancos de dados populacionais, tendo apenas a variante p.(Trp294Cys) sido encontrada no ABraOM, bancos de dados populacional da Cidade de São Paulo, apresentando apenas a presença de um único alelo na base de dados. Dentre os 7 CIs com variante VUS identificada, 5 foram sequenciados pela plataforma ION Torrent e 2 pela plataforma Illumina.

Tabela 6 - Variantes encontradas no gene *APOE*

Gene	Variante	Tipo de variante	Família	Predição <i>in silico</i>	gnomAD	ABraOM	Kaviar	Literatura médica	Classificação ACMG
<i>APOE</i>	p.(Thr11Ala) c.31A>G	Missense	A	Benigna (4/4)	0,00001415	-	0,000045	-	VUS
<i>APOE</i>	p.(Pro28Leu) c.83C>T	Missense	C	Benigna (3/4)	0,000004017	-	0,000013	Alzheimer Kamboh <i>et al</i> (1999)	VUS
<i>APOE</i>	p.(Met82Arg) c.1744G>A	Missense	-	Deletéria (4/4)	0,000004020	-	-	-	VUS
<i>APOE</i>	p.(Gln264Arg) c.791A>G	Missense	-	Conflitante (2/4)	-	-	-	Hipertrigliceridemia Di Filippo <i>et al</i> (2014)	VUS
<i>APOE</i>	p.(Arg269Gly) c.805C>G	Missense	B	Deletéria (3/4)	0,0003605	-	0,000167	-	VUS
<i>APOE</i>	p.(Trp294Cys) c.882G>T	Missense	D	Deletéria (4/4)	0,00001181	1 alelo	0,000026	-	VUS

As variantes novas estão representadas em negrito. A predição *in silico* está representada pelo número de algoritmos concordantes com a predição.

(A) ■ p.(Thr11Ala) no gene *APOE*(B) ■ p.(Arg269Gly) no gene *APOE*(C) ■ p.(Pro28Leu) no gene *APOE*(D) ■ p.(Trp294Cys) no gene *APOE***Figura 6** - Heredograma das famílias A, B, C e D.

Os casos índices estão representados pela seta. * sob uso de medicamento

5.2. Análise do gene *STAP1*

Dentre os 265 CIs, foram identificados 3 CIs (1,13%) portadores de variantes VUS no gene *STAP1*, sendo que a alteração p.(Pro176Ser) foi identificada em 2 pacientes. A outra variante encontrada, a p.(Trp294Cys), é nova e está representada em negrito na Tabela 7. Os heredogramas das famílias estão representados na Figura 7.

Tabela 7 - Variantes encontradas no gene *STAP1*

Gene	Variante	Tipo de variante	Família	Predição <i>in silico</i>	gnomAD	ABraOM	Kaviar	Literatura médica	Critério ACMG	Classificação ACMG
<i>STAP1</i>	p.(Arg149Lys) (c.446G>A)	Missense	A	Discordante (2/4)	-	-	-	-	PM2	VUS
<i>STAP1</i>	p.(Pro176Ser) (c.526C>T)	Missense	B, C	Deletéria (4/4)	0,0003274	-	0,000283	Lamiquiz-Moneo <i>et al</i> (2019) Blanco-Vaca <i>et al</i> (2018)	PP3, PP5, BP6	VUS

A variante nova está representada em negrito. A predição *in silico* está representada pelo número de algoritmos concordantes com a predição.

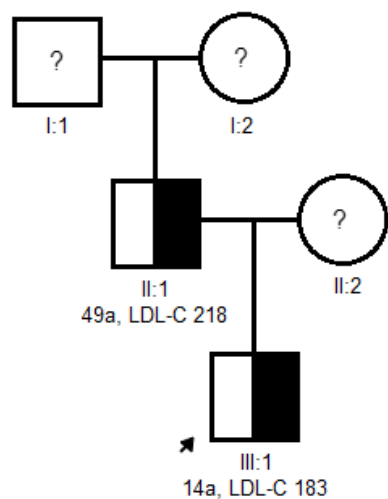
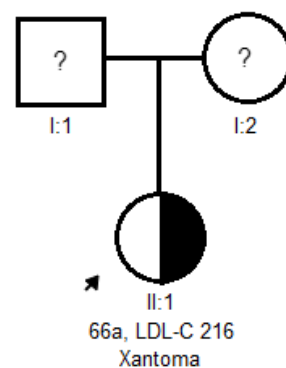
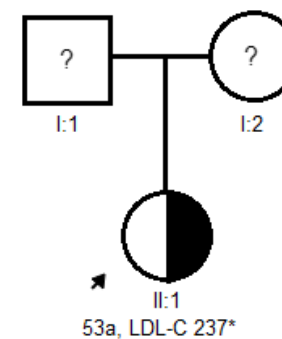
(A) ■ p.(Arg149Lys) no gene *STAP1*(B) ■ p.(Pro176Ser) no gene *STAP1*(C) ■ p.(Pro176Ser) no gene *STAP1*

Figura 7 - Heredograma das famílias A, B e C.

Os casos índices estão representados pela seta. * sob uso de medicamento

5.3. Análise dos genes *ABCG5* e *ABCG8*

Foi analisado os genes *ABCG5/8* de 265 CIs. Estes foram separados em pacientes com suspeita de STSL e sem suspeita de STSL. O critério utilizado para a seleção destes pacientes foram: LDL-C \geq 300 mg/dL, presença de xantomas ou drástica redução dos níveis de LDL-C através de dieta ou pelo uso de ezetimiba. Sendo assim, 42 CIs tinham suspeita de STSL. O diagnóstico genético de STSL foi confirmado em 7 CIs (2,64%; STSL positivo), sendo 6 pertencentes ao grupo com suspeita de STSL. Apenas 1 CI não teve a confirmação do arranjo trans realizado pela impossibilidade de abertura da família. As características clínicas e bioquímicas dos pacientes com e sem diagnóstico genético de STSL estão representados na Tabela 8. O fluxograma representando a divisão dos casos suspeitos de STSL, assim como o resultado do teste genético e análise familiar estão representados na Figura 8. Foram identificadas 9 variantes genéticas, sendo 4 *nonsense*, 2 pequenas deleções, 2 *missense* e 1 variante em sítio de *splicing*. Todas as variantes *nonsense* e uma das alterações *missense* foram descritas previamente e o restante eram variantes novas. Todas as variantes foram classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, como descrito na Tabela 9.

Tabela 8 - Características clínicas e bioquímicas dos pacientes STSL positivo x STSL/HF negativo

Parâmetro	STSL positivo (7)	STSL/HF negativo (253)	p value
Idade (anos)	25 (10,0-44,0)	48 (31,3-59,0)	0,023
Sexo			
Mulher (%)	5 (71,4)	172 (68)	0,604
Homens (%)	2 (28,6)	81 (32)	0,604
Raça autodeclarada			
Branco (%)	4 (66,7)	123 (59,4)	0,853
Pardo (%)	2 (33,3)	60 (29,0)	0,853
Preto (%)	0 (0,0)	21 (10,1)	0,853
Outros ou não-declarado (%)	0 (0,0)	3 (1,4)	0,853
Exames bioquímicos basais			
CT (mg/dL)*	418,0 (262,0-480,0)	324,0 (301,5-351,0)	0,102
LDL-C (mg/dL)*	352,0 (203,0-462,0)	240,0 (221,0-261,3)	0,060
HDL-C (mg/dL)*	47,0 (41,0-47,0)	51,0 (44,0-62,0)	0,145
TG (mg/dL)*	88,0 (63,0-126,0)	132,0 (96,0-189,5)	0,014
Exames bioquímicos atual			
CT (mg/dL)	162,0 (157,0-220,0)	302,5 (251,3-338,0)	<0,001
LDL-C (mg/dL)	101,0 (93,0-137,0)	223,0 (171,0-249,0)	<0,001
HDL-C (mg/dL)	55,0 (47,0-58,0)	51,0 (44,0-62,0)	0,656
TG (mg/dL)	74,0 (56,0-92,0)	135,0 (93,0-180,0)	0,003
Exame físico			
Arco corneano (%)	1 (14,3)	16 (6,5)	0,389
Xantoma (%)	4 (57,1)	9 (3,6)	<0,001
Xantelasma (%)	3 (42,9)	23 (9,3)	0,025
Histórico médico			
Tratamento farmacológico (%)	6 (85,7)	153 (61,2)	0,181
Estatina	5 (71,4)	138 (60,5)	0,437
Ezetimiba	2 (28,6)	45 (20,3)	0,439
Hipertensão (%)	1 (20,0)	49 (40,5)	0,338
Diabetes (%)	0 (0,0)	26 (20,0)	0,337
Tabagismo (%)	2 (28,6)	73 (39,2)	0,653
IMC (kg/m ²)	18,8 (17,8-19,4)	26,3 (22,8-29,4)	0,004
DAC precoce (%)	2 (40,0)	28 (11,6)	<0,001
DAC subclínica (%)	2 (40,0)	6 (2,5)	<0,001
Histórico familiar de DAC (%)	4 (66,7)	109 (53,7)	0,421
Crianças (%)	2 (28,6)	43 (17,0)	0,348

*Valor de colesterol sem tratamento ou maior valor de colesterol sob tratamento. DCV precoce: homens < 55 anos e mulheres < 65 anos. Variáveis quantitativas estão expressas em medianas (1º e 3º quartis). Variáveis categóricas estão expressas em valores absolutos e porcentagens. O histórico médico de crianças somente teve o valor de IMC avaliado.

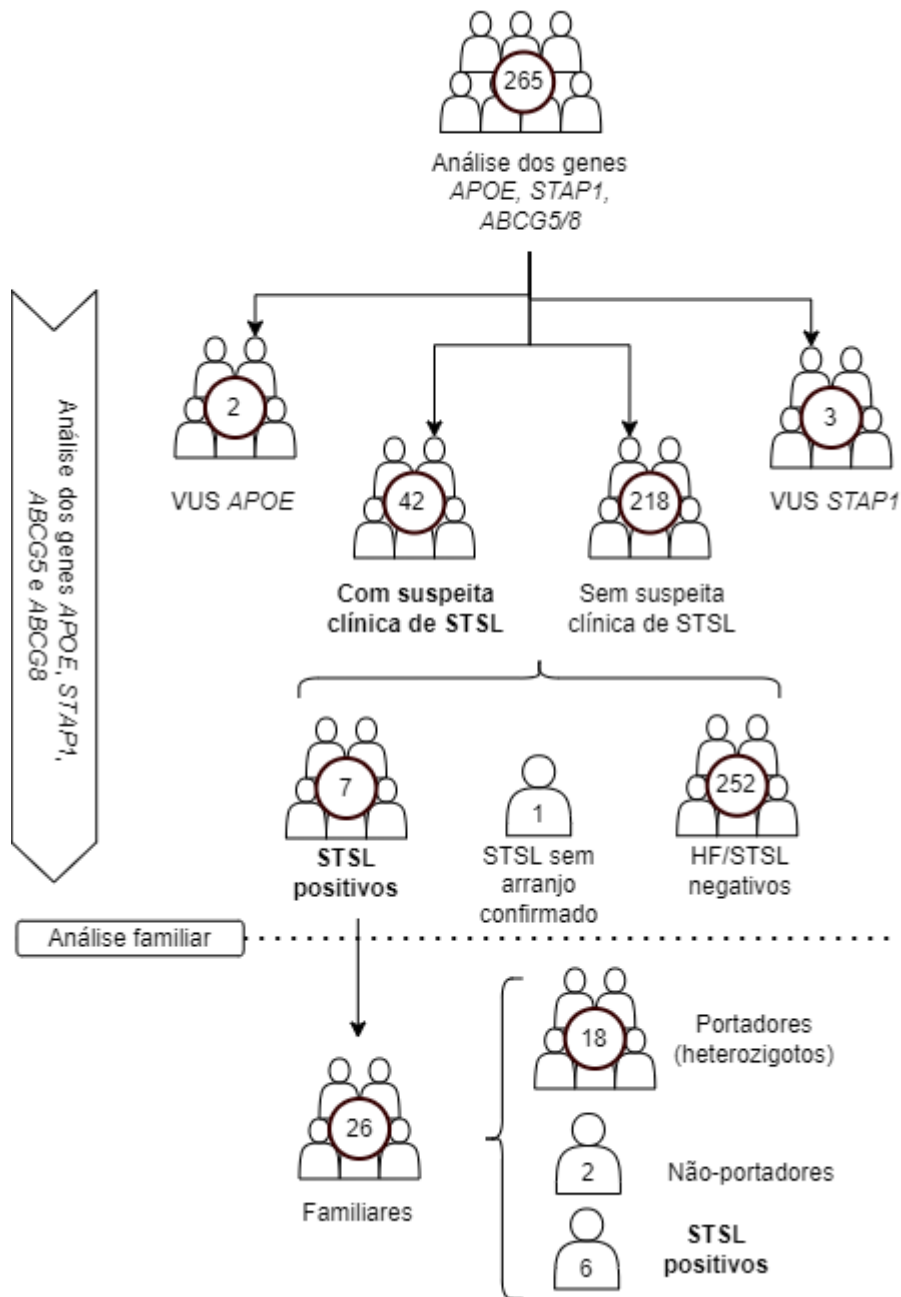


Figura 8 – Resultado da análise molecular para rastreamento da Sitosterolemia

Tabela 9 - Descrição das variantes encontradas nos genes *ABCG5* e *ABCG8*

Gene	Variante	Tipo de variante	Família	Predição <i>in silico</i>	gnomAD	ABraOM	Kaviar	Literatura médica	Classificação ACMG
<i>ABCG5</i>	p.(Gln22*) c.64C>T	<i>Nonsense</i>	F	Deletéria (1/1)	0,000045	-	0,000071	Su (2006)	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Arg389His) c.1166G>A	<i>Missense</i>	G	Conflitante (2/4)	0,000149	-	0,000122	Huang D <i>et al</i> (2019)	VUS
<i>ABCG5</i>	p.(Arg389Cys) c.1165C>T	<i>Missense</i>	G	Deletéria (4/4)	0,000020	-	0,000019	-	VUS
<i>ABCG5</i>	p.(Phe630fs*8) c.1889_1889delT	Pequena deleção	F	Deletéria (1/1)	-	0,000821	0,000006	-	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Trp361*) c.1083G>A	<i>Nonsense</i>	A, C, H	Deletéria (1/1)	0,000937	-	0,000998	Berge KE <i>et al</i> (2000)	Patogênica
<i>ABCG8</i>	c.1212-1G>C	Sítio de splicing	B	Deletéria ▲	0,000032	-	-	-	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Arg412*) c.1234C>T	<i>Nonsense</i>	C	Deletéria (1/1)	0,000092	-	0,000090	Berge KE <i>et al</i> (2000)	Patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Tyr492*) c.1476T>A	<i>Nonsense</i>	B, D, E	Deletéria (1/1)	0,000036	-	0,000052	Hansel B <i>et al</i> (2014)	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Ser609Thrfs*54) c.1826delG	Pequena deleção	D, H	Deletéria (1/1)	-	-	-	-	Provavelmente patogênica

Variantes novas estão em negrito; a predição *in silico* de todas as variantes *nonsense* e pequenas deleções foram classificadas utilizando apenas o programa Mutation Taster; ▲: variante presente em sítio de *splicing* foi predita pelo programa Human Splicing Finder de possuir alteração no sítio acceptor; variantes *missense* foram preditas pelos programas Provean, SIFT, PolyPhen-2 e Mutation Taster; a presença de publicação científica foi pesquisada nos bancos de dados Pubmed, ClinVar e HGMD.

5.3.1. Análise familiar

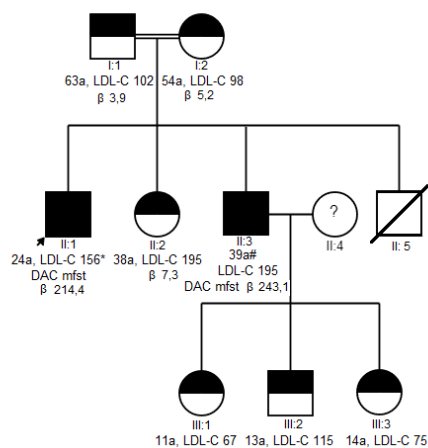
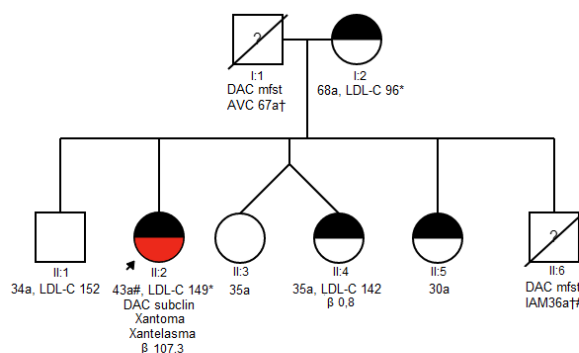
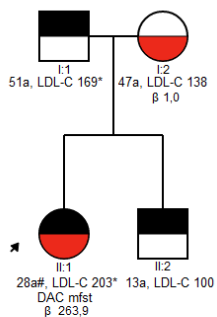
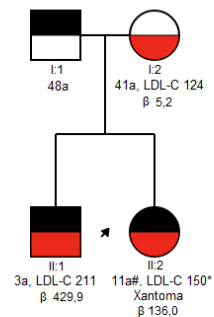
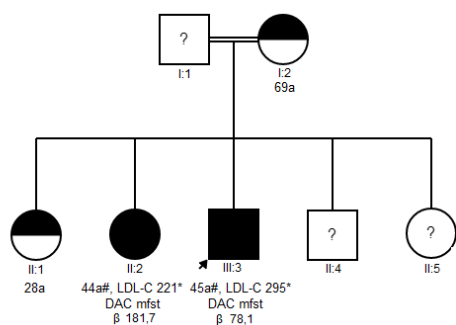
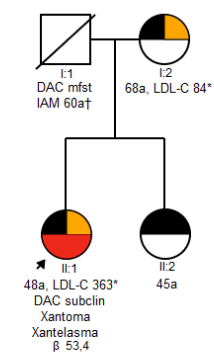
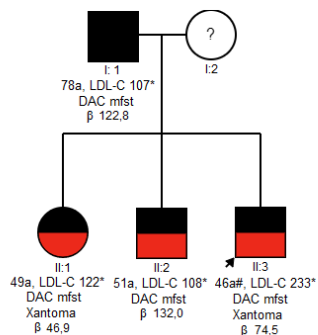
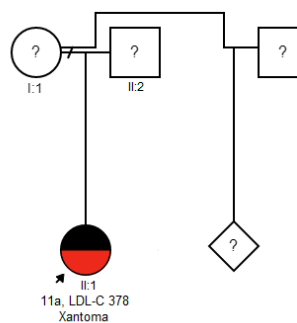
Foi realizado a abertura da família de 7 CIs, sendo convocado todos os parentes de primeiro grau caso concordem em participar do estudo. Estes foram nomeados de Família A à Família H. Apenas o CI da Família H não teve a abertura da família realizada, impossibilitando a confirmação do arranjo. Ao total, foram convocados 26 familiares, sendo 6 familiares positivos para STSL, 18 portadores (heterozigotos) e 2 sem variante a variante presente na família. Os primers utilizados para sequenciamento dos familiares podem ser encontrados no Anexo .

As características clínicas e bioquímicas dos pacientes com STSL confirmada estão representadas na Tabela 10, assim como a dosagem de fitosterol realizada. Características clínicas e bioquímicas adicionais estão representadas no Anexo B. Os heredogramas das famílias estão representados na Figura 9.

Tabela 10 - Características clínicas e bioquímicas de todos os homozigotos ou heterozigoto compostos

Paciente	Idade	Histórico familiar de DAC	Xantoma/Xantelasma		DAC manifesta ou subclínica		Ateromatose carotídea		LDL-C mg/dL			β -Sitosterol $\mu\text{g/mL}$	Campesterol $\mu\text{g/mL}$	Alteração Hematológica
			Presença	Idade	Presença	Idade	Presença	Idade	Atual	↓	↑			
A-II:1*	25	Não	Sim/Não	5	Sim/mfst	25	Sim	23	93 ^(1,2)	93 ^(1,2)	352 ⁽¹⁾	214,43 ⁽¹⁾	49,65 ⁽¹⁾	Não
A-II:3	39	Não	Sim/Não	10	Sim/mfst	32	Sim	36	157 ^(1,2)	58 ^(1,2)	250 ^(1,2)	243,14 ⁽¹⁾	51,57 ⁽¹⁾	Sim
B-II:2*	43	Sim	Yes/Yes	38	Sim/subclin	40	-	-	196 ^(1,2)	93 ^(1,2)	196 ^(1,2)	107,33 ^(1,2)	18,07 ^(1,2)	Sim
C-II:1*	28	Não	Não/Não	-	Sim/mfst	20	Sim	25	57 ^(1,3)	57 ^(1,3)	203 ⁽³⁾	263,93 ⁽³⁾	51,91 ⁽³⁾	Sim
D-II:2*	11	Não	Não/Não	-	Não	-	-	-	137 ^(1,2)	95 ^(1,2)	462 ⁽¹⁾	136,01 ^(1,2)	18,45 ^(1,2)	Sim
D-II:1	3	Não	Sim/Não	3	Não	-	-	-	251 ⁽⁰⁾	211 ⁽⁰⁾	251 ⁽⁰⁾	429,90 ⁽⁰⁾	68,94 ⁽⁰⁾	Sim
E-II:3*	45	Sim	Não/Não	-	Sim/mfst	40	Sim	44	101 ^(1,2)	84 ^(1,2)	295 ⁽¹⁾	78,12 ⁽¹⁾	16,12 ⁽¹⁾	Sim
E-II:2	44	Sim	Não/Não	-	Sim/mfst	40	-	-	88 ^(1,2)	56 ^(1,2)	215 ⁽¹⁾	181,67 ⁽¹⁾	50,06 ⁽¹⁾	Sim
F-II:1*	48	Sim	Yes/Yes	-	Sim/subclin	40	Sim	45	103 ^(1,2,4)	90 ^(1,2)	521 ^(2,3)	53,41 ^(1,2,4)	11,29 ^(1,2,4)	Sim
G-II:3*	46	Não	Sim/Não	-	Sim/mfst	31	-	-	89 ⁽¹⁾	89 ⁽¹⁾	223 ⁽¹⁾	74,53 ⁽¹⁾	16,68 ⁽¹⁾	Sim
G-II:1	49	Não	Sim/Não	-	Sim/mfst	42	-	-	122 ^(2,4)	122 ^(2,4)	122 ^(2,4)	46,88 ^(2,4)	9,67 ^(2,4)	-
G-II:2	51	Não	No/Yes	-	Sim/mfst	49	-	-	126 ⁽⁵⁾	108 ⁽⁵⁾	126 ⁽⁵⁾	122,83 ⁽⁵⁾	26,42 ⁽⁵⁾	Não
G-I:1	78	Não	Não/Não	-	Sim/mfst	45	-	-	107 ⁽¹⁾	84 ⁽¹⁾	172 ⁽⁰⁾	132,01 ⁽¹⁾	26,81 ⁽¹⁾	Sim
H-II:1*	11	Não	Sim/Não	7	Não	-	-	-	97 ^(2,4)	97 ^(2,4)	378 ^(2,4)	-	-	-

*: Caso-índice; -: ausência de informação; Alterações hematológicas são definidas como tendo trombocitopenia, macrotrombocitopenia, anemia e/ou alteração da morfologia do eritrócito; mfst: manifesta; subclin: subclínica; 0: basal; 1: atorvastatina; 2: ezetimiba; 3: rosuvastatina; 4: colestiramina. Não foi considerado como histórico familiar de DAC positivo se somente os membros com DAC forem familiares com STSL confirmada de forma genética.

(A) ■ p.(Trp361*) no gene *ABCG8*(B) ■ c.1212-1G>C e ■ p.(Tyr492*) no gene *ABCG8*(C) ■ p.(Trp361*) e ■ p.(Arg412*) no gene *ABCG8*(D) ■ p.(Tyr492*) e ■ p.(Ser609Thrfs*54) no gene *ABCG8*(E) ■ p.(Tyr492*) no gene *ABCG8*(F) ■ p.(Gln22*) e ■ p.(Phe630fs*8) no gene *ABCG5*■ p.(Gly504Val) no gene *PCSK9*(G) ■ p.(Arg389His) e ■ p.(Arg389Cys) no gene *ABCG5*(H) ■ p.(Trp361*) e ■ p.(Ser609Thrfs*54) no gene *ABCG8***Figura 9** - Heredograma das famílias A à H de Sitosterolemia.

Heredograma das famílias em que foram encontradas alterações genéticas patogênica ou provavelmente patogênica. Idade em anos, TC e LDL-C em mg/dL e são referentes aos exames no recrutamento. β: β-sitosterol em ug/mL. DAC mfst: doença arterial coronariana manifesta. DAC subclin: doença arterial coronariana subclínica. *com medicamento; #alteração hematológica (trombocitopenia, macrotrombocitopenia ou anemia); ?Análise genética não realizada; †causa da morte; †caso-índice

5.3.1.1. Família A

A família A é portadora da variante p.(Trp361*) no gene *ABCG8* (Figura 9A). O CI (II:1) é um homozigoto para esta variante, de 25 anos de idade. Ele possuía xantomas nos joelhos e cotovelos desde os 5 anos, iniciou tratamento hipolipemiante (ezetimiba) desde os 16 anos, tinha DCVA subclínica desde os 20 anos e teve o primeiro infarto do miocárdio aos 25 anos. Seu irmão também homozigoto para esta variante (II :3) tinha 39 anos, apresentou xantomas desde os 10 anos de idade, iniciou terapia hipolipemiante (atorvastatina) aos 18 anos e teve IAM aos 32 anos. Seus pais (I:1 e I: 2) são primos de primeiro grau, cada um deles portando a variante p.(Trp361*) em heterozigose.

5.3.1.2. Família B

A família B é portadora das variantes c.1212-1G>C e p.(Tyr492*) no gene *ABCG8* (Figura 9B). O CI (II:2) era uma mulher de 43 anos que carregava ambas as variantes. Apresentava xantelasma bilateral, bem como xantomas nos tendões e região infrapatelar desde os 38 anos. Iniciou tratamento hipolipemiante (sinvastatina) aos 35 anos e, aos 40, realizou angiotomografia computadorizada, que revelou escore de cálcio coronariano (CAC) de 111 unidades Agatston (> 90º percentil para idade e sexo). Seu irmão (II:6) não fez o teste genético, mas foi diagnosticado com anemia hipoproliferativa aos 31 anos e foi submetido a um transplante de medula óssea. Cinco anos depois, aos 36 anos, ele faleceu devido a IAM. O rastreamento em sua mãe (I:2) confirmou a presença de uma variante, a c.1212-1G>C. O pai (I:1) tinha histórico de dislipidemia, teve infarto do miocárdio aos 55 anos, sofreu acidente vascular cerebral e faleceu aos 67 anos.

5.3.1.3. Família C

A família C é portadora das variantes p.(Trp361*) e p.(Arg412*) no gene *ABCG8* (Figura 9C). O IC (II:1) era portadora de ambas as variantes. Ela tinha 28 anos e iniciou terapia hipolipemiante (ezetimiba) aos 20 anos, após apresentar angina instável e

realizar cineangiocoronariografia, que revelou aterosclerose coronariana triarterial. O pai (I:1) tinha 51 anos e apresentava 258 mg/dL de CT e 169 mg/dL de LDL-C com 20 mg de rosuvastatina; a mãe (I:2) tinha 47 anos e apresentava 230 mg/dL de CT e 138 mg/dL de LDL-C sem uso de medicação.

5.3.1.4. Família D

A família D é portadora das variantes p.(Tyr492*) e p.(Ser609Thrfs*54) no gene *ABCG8* (Figura 9D). A IC (II:2) era uma menina de 11 anos que começou a apresentar xantomas aos 3 anos (Figura 10B), teve dislipidemia identificada aos 6 anos e iniciou a terapia hipolipemiante um ano mais tarde. Seu irmão de 3 anos (II:1) também era portador das duas variantes e apresentava hipercolesterolemia desde os 2 anos (LDL-C: 251 mg/dL; junho/2019). Seu pai (I:1) era portador da variante p.(Tyr492*) e sua mãe (I:2) era portadora da variante p.(Ser609Thrfs*54), ambos em heterozigose.

5.3.1.5. Família E

A família E é portadora da variante p.(Tyr492*) no gene *ABCG8* (Figura 9E). O CI homozigoto (II:3) era um homem de 45 anos. Não apresentava xantomas ou xantelasmas, mas tinha história de dois infartos do miocárdio aos 40 e 43 anos. Sua irmã, também HMZ (II:2), tinha 44 anos e teve um infarto do miocárdio aos 40 anos. Sua angiotomografia computadorizada da coronariana mais recente (dezembro/2019) mostrou estenose uniarterial e a decisão médica foi por tratamento clínico inicialmente. Seus pais eram primos em primeiro grau, e a heterozigose foi confirmada em sua mãe (I:2), mas a informação sobre seu pai (I:1) não estava disponível.

5.3.1.6. Família F

A família F era portadora das variantes p.(Gln22*) e p.(Phe630fs*8) no gene *ABCG5* (Figura 9F) para STSL, juntamente com a p.(Gly504Val), uma VUS para HF no gene *PCSK9*. A CI (II:1) era uma mulher de 48 anos, portadora de xantelasmas bilaterais e xantomas nas mãos (Figura 10A). A análise familiar mostrou que as duas

variantes nulas em *ABCG5* estavam em trans. Iniciou a terapia hipolipemiante aos 40 anos e a angiotomografia de coronárias revelou estenose de dois vasos e escore CAC de 114 unidades Agatston (percentil 99º para idade e sexo). A mãe (I:2) era portadora das variantes VUS e p.(Gln22*), seu CT e LDL-C são respectivamente 154 mg/dL e 84 mg/dL com 20 mg de sinvastatina.

5.3.1.7. Família G

A família G é portadora das variantes p.(Arg389His) e p.(Arg389Cys) no gene *ABCG5* (Figura 9G). Essas variantes estão no mesmo aminoácido 389 e foram confirmadas como trans através da análise dos *reads* no programa IGV (Anexo C). O IC (II:3) era um homem de 46 anos que apresentava xantomas tendinosos bilaterais, teve dois infartos do miocárdio, o primeiro aos 31 anos, dando início a terapia hipolipemiante. Sua irmã (II:1) tinha 49 anos, também apresentava ambas as variantes em trans e exibia xantomas tendinosos bilaterais. Teve o diagnóstico de hipercolesterolemia aos 42 anos e começou a usar estatinas desde então. Aos 45 anos, teve o diagnóstico de estenose coronária triarterial (> 70% de obstrução), sendo submetida a angioplastia com colocação de 3 stents coronarianos. Seu irmão (II:2) tinha 51 anos e também apresentava ambas as variantes em trans; ele teve xantelasma e iniciou terapia hipolipemiante após seu primeiro infarto do miocárdio aos 49 anos. O pai do CI (I:1) tinha 78 anos e teve um infarto do miocárdio aos 45 anos seguido de angioplastia coronariana e colocação de 4 stents na artéria coronária. O sequenciamento Sanger deste paciente revelou a presença da variante p.(Arg389His) em HMZ, confirmando assim a STSL. A dosagem de fitoesteróis revelou que todos os membros da família apresentaram níveis extremamente elevados de β -sitosterol e campesterol em relação aos valores de referência.

5.3.1.8. Família H

A família H é portadora das variantes p.(Trp361*) e p.(Ser609Thrfs*54) no gene *ABCG8*, mas não foi possível expandir o rastreamento familiar (Figura 9H). O CI (II:1) era uma menina de 11 anos com grandes xantomas em ambos os cotovelos e menos extensos na região interglútea e abdominal (Figura 10C-I). Seu CT foi de 473 mg/dL e LDL-C foi de 378 mg/dL sem medicamentos, e após tratamento com 10 mg de rosuvastatina e 10 mg de ezetimiba, em combinação com uma dieta restritiva de fitoesteróis, seu CT caiu para 157 mg/dL e LDL-C a 97 mg/dL. Não foi observada regressão no tamanho dos xantomas após 6 meses de tratamento (Figura 10C-II), mas após 1 ano, eles regrediram conforme observado na Figura 10C-III. Ela não tem história familiar de hipercolesterolemia, e sua mãe e seu meio-irmão são normolipidêmicos.

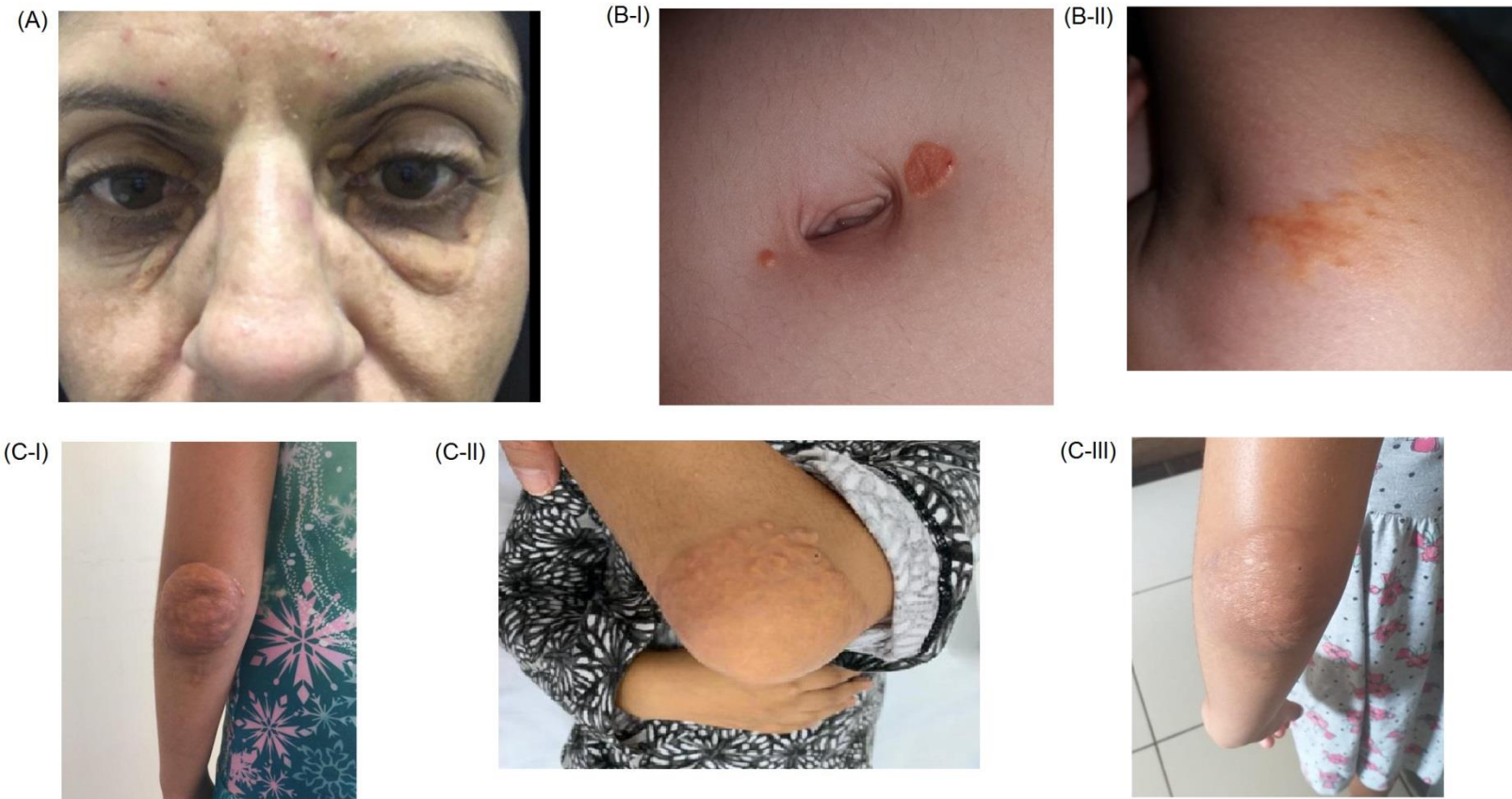


Figura 10 - Sinais clínicos de alguns pacientes com STSL.

(A) Xantelasma bilateral do CI II:1 da família F, (B) Xantoma na região peri-umbilical (I) e região posterior da axila (II), respectivamente, do familiar II:1 da família D, (C) Xantoma em cotovelo antes do tratamento (I), após 6 meses de tratamento (II) e após 1 ano de tratamento (III), respectivamente, do CI II:1 da família H.

5.3.1. Análise de variantes em heterozigose - genes *ABCG5/ABCG8*

Com o intuito de avaliar também a frequência de variantes de perda de função em heterozigose, em nossa coorte, realizamos o rastreamento tanto em CIs HF negativos (n=265) quanto em HF positivos (n=147). Foi possível identificar 4 portadores (1,5%) entre os HF negativos e 2 portadores (1,4%) entre os HF positivos. As características clínicas e laboratoriais destes portadores estão representados no Anexo D, e as variantes identificadas estão representadas no Anexo E. A frequência desses portadores foi então comparada com a frequência de variantes de perda de função do UK Biobank, banco de dados composto por 200.643 exomas. Foi utilizado os mesmos critérios de classificação de variantes e foi observado 332 portadores ao total, sendo 190 no gene *ABCG5* e 142 no gene *ABCG8* (Anexo F). Não foi observado a presença de homozigotos ou heterozigoto composto.

6. Discussão

6.1. Gene *APOE*

Foi analisado o gene *APOE* de 505 CIs sequenciados pela metodologia ION Torrent e 265 CIs sequenciados pela metodologia Illumina, totalizando 770 CIs. Destes, foram identificadas variantes VUS em 7 pacientes, ou seja, em 0,91% dos casos. Um número menor em relação ao que foi encontrado pelo estudo realizado por Wintjens *et al* (2016)³⁷, que identificou variante em 1,3% da sua coorte negativa para os genes canônicos da HF. Porém, o critério de inclusão utilizado neste estudo (n=229) foi ter a classificação do *Dutch Lipid Clinic Network* como “definitivo” (46%), “provável” (34%) e “possível” (20%), sendo a maioria pertencente a classificação com maior pontuação, fato que poderia contribuir para um maior achado de variantes neste gene.

Um estudo realizado por Khalil *et al*³⁸, realizaram o rastreamento de variantes raras no gene *APOE* em uma coorte de 5743 CIs que possuíam diagnóstico de HF ou Hiperlipidemia Familiar Combinada, e identificaram 31 variantes distintas em 76 CIs totais, tendo uma frequência de 1,3%, mesma encontrada por Wintjens *et al*. Neste estudo também foi realizado o cálculo do escore poligênico, sendo possível constatar que os portadores de variantes raras no gene *APOE* classificadas como patogênica ou provavelmente patogênica possuíam um escore menor do que àqueles que possuíam apenas variantes classificadas como benigna, sugerindo que a hipercolesterolemia poligênica, nos casos em que foram encontradas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, não eram a causa da hipercolesterolemia nesses portadores³⁸.

Dentre as variantes encontradas, duas já foram reportadas na literatura médica, porém nenhuma delas foi relacionada à hipercolesterolemia ou à HF, mas sim para a doença de Alzheimer ou Hipertrigliceridemia. Já a variante p.(Leu167del), primeira variante associada à HF no gene *APOE*, não foi identificada em nossa coorte.

A variante p.(Trp294Cys) foi predita como deletéria pelos 4 algoritmos de predição utilizados na análise, porém teve a presença de um alelo identificado no banco de dados ABraOM, apresentando assim, evidências discordantes para interpretação da variante.

O número limitado de familiares convocados assim como a dosagem de colesterol presente em somente alguns familiares impossibilita uma análise de co-segregação familiar informativa, uma vez que todas essas famílias portadoras de variante VUS encontradas residem fora do estado de São Paulo, impossibilitando a coleta sanguínea em nossa instituição para uma correta avaliação clínica e bioquímica.

6.2. Gene *STAPI*

A variante VUS p.(Pro176Ser) encontrada em dois CIs está presente em baixa frequência nos bancos de dados populacionais e é considerada como deletéria pelos quatro algoritmos de predição *in silico* utilizados. Esta variante é a mesma encontrada por Blanco-Vaca *et al*, que realizaram a identificação em um indivíduo após ele sofrer um IAM aos 55 anos de idade. A análise de bioinformática realizada por esta equipe concluiu que dentre as alterações no gene *STAPI* reportadas, a variante p.(Pro176Ser) era considerada a mais deletéria em comparação com as demais. Porém, ao realizar a co-segregação familiar, identificaram que o fenótipo não era acompanhado do genótipo na família analisada, contradizendo a identificação da causa genética identificada⁴².

A partir do momento em que o gene *STAPI* foi reportado como associado à HF em 2017, gerou um grande interesse pelo estudo deste gene. Deste modo, o gene *STAPI* acabou sendo adicionado em artigos de revisão fazendo parte da “lista de genes associados à HF”, sendo então incorporado nos painéis genéticos de HF de diversos laboratórios, e apesar da incerteza com relação a real associação deste gene à doença, levou a identificação de outras variantes raras que acabaram contribuindo com evidências para a casualidade deste gene à HF⁷³. Por outro lado, incitou uma

investigação mais ampla, como a realizada por Lamiquiz-Moneo *et al* em 2019, que realizaram a identificação de 17 variantes raras e a co-segregação familiar de 4 delas. A co-segregação foi realizada em 7 famílias ao total e incluía inclusive a variante p.(Glu97Asp), a primeira associada à HF. A conclusão deste estudo foi que em todas as famílias em que foi realizado o estudo de co-segregação familiar, nenhuma delas segregava o genótipo com o fenótipo, sugerindo que variantes no gene *STAPI* não estaria associado com a hipercolesterolemia nas famílias analisadas⁴³. Já em 2020, Hegele *et al* realizaram a compilação de diversos estudos envolvendo o gene *STAPI* e a HF, de 2014 à 2020, e realizaram uma análise crítica dos trabalhos encontrados, e concluíram que alguns estudos onde havia análise familiar, a presença da variante encontrada, na maioria das vezes, não era acompanhada da hipercolesterolemia, mesmo com a análise de bioinformática predizendo que as variantes em estudo eram consideradas deletérias. Assim, concluem que o gene *STAPI* não está associado à HF e que não sugerem a análise deste gene em casos suspeitos de HF. No mesmo mês da publicação de Hegele *et al*, Loaiza *et al* realizaram um estudo com camundongos *knockout* para o gene *STAPI* e não identificaram diferença nos níveis plasmáticos de lipídeos. Além disso, avaliando a cultura celular de células HepG2, não houve diferença na expressão do mRNA do *LDLR* ou internalização na partícula de LDL, concluindo também que o gene *STAPI* não seria um gene associado à HF⁷⁴.

Em nosso estudo, o número limitado de familiares recrutados e que possuem valores de colesterol dosado impossibilita uma análise de co-segregação familiar informativa, uma vez que duas das três famílias residem fora do estado de São Paulo, impossibilitando uma análise mais detalhada em nosso instituto.

6.3. Genes *ABCG5/8*

A seleção dos pacientes classificados como suspeitos de STSL teve uma grande influência na identificação de casos positivos (2,64%), uma vez que 6 dos 7 (85,7%) CIs

pertenciam a este grupo. Além disso, 3 dos 6 (50,0%) CIs do grupo suspeito de STSL e que positivaram eram pertencentes ao grupo de amostras que haviam sido selecionadas para novo sequenciamento (inicialmente feito pela metodologia ION Torrent), para avaliação dos genes *ABCG5/8*. Portanto, o número de positivos encontrado nesta coorte pode não ser representativa de um programa genético de rastreamento.

Realizando a comparação entre os grupos com STSL confirmada e não-confirmada, é possível observar que os STSL confirmados são mais jovens (25 anos vs 48 anos, $p=0,023$), apresentam uma menor concentração de CT e LDL-C atual (162 mg/dL vs 302 mg/dL, $p<0,001$ e 101 mg/dL vs 223 mg/dL, $p<0,001$, respectivamente), exibem um maior número de portadores de xantomas e xantelasmas (57% vs 3,6%, $p<0,001$ e 43% e 9%, $p=0,025$, respectivamente) e apresentam uma maior porcentagem tanto de DAC precoce como de DAC subclínica (40% vs 11,6%, $p<0,001$ e 40% vs 2,5%, $p<0,001$, respectivamente; Tabela 8).

Dentre os pacientes com STSL confirmada, 100% dos adultos apresentaram DAC manifesta ou subclínica, achados que suportam a prévia associação da STSL com o alto risco de aterosclerose^{58,75}. Por outro lado, Hansel *et al* identificou a presença da STSL em 5 pacientes e não encontrou sinais de aterosclerose, mesmo apresentando altas concentrações de colesterol e fitosterol, sugerindo a aterosclerose na STSL poderia ser devido a mecanismos independentes do aumento de fitosteróis. Entretanto, é importante observar que os 5 pacientes em estudo possuíam entre 11 a 21 anos de idade e foram diagnosticadas e tratadas precocemente.

Os CIs com STSL confirmada apresentaram uma média de β -sitosterol e campesterol de $160,3\pm 107,1$ e $32,0\pm 19,6$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e assim 44 vezes e 18 vezes maior quando comparados com seus familiares heterozigotos ($n=11$), em que a média do β -sitosterol e campesterol foi de $3,6\pm 2,5$ $\mu\text{g/mL}$ e $1,8\pm 1,2$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente e 123 vezes e 53 vezes maior quando comparado aos controles,

apresentando uma média de β -sitosterol e campesterol de 1,3 $\mu\text{g/mL}$ e 0,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Anexo G). O menor valor de β -sitosterol encontrado (46,88 $\mu\text{g/mL}$) foi aproximadamente 3 vezes maior do que o valor utilizado para diagnóstico (15 $\mu\text{g/mL}$) de STSL, reforçando que as variantes encontradas são as prováveis causas da STSL.

Todas as alterações encontradas são consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas, seguindo os critérios de classificação do ACMG⁷¹, e até o presente momento, ao total, somente foram reportadas 80 variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas no banco de dados ClinVar, sendo 38 no gene *ABCG5* e 42 no gene *ABCG8*⁷⁶.

Além do rastreamento de portadores de variantes em homozigose ou heterozigose composta em nossa coorte, também realizamos o rastreamento de variantes em heterozigose (portadores) em nossa coorte. Foi identificado a presença de 4 heterozigotos (1,5%) entre os CIs HF negativos (n=265) e 2 heterozigotos (1,4%) entre os CIs HF positivos (n=147). Para a comparação da frequência alélica encontrada, utilizamos o banco de dados UK Biobank, banco composto por 200.643 exomas. Foi utilizado os mesmos critérios de classificação de variantes e observado a presença de 332 portadores heterozigotos, sendo 190 no gene *ABCG5* e 142 no gene *ABCG8*. O resultado desta comparação mostra que a frequência de portadores em nossa coorte é 8,3 vezes mais frequente em nossa coorte do que na população geral (p=0,001), sugerindo que além do alto número de casos de STSL encontrados em nossa coorte, as variantes em heterozigose podem desempenhar um papel importante na dislipidemia severa.

Em diversos casos onde foi confirmada a STSL, a suspeita de HF era a principal causa. Não somente por sua incidência que é muito maior do que a incidência estimada da STSL, mas também pelo fenótipo, que se assemelham, como a presença de hipercolesterolemia. Na dosagem do colesterol através do método colorimétrico, não é

possível a diferenciação entre colesterol e fitosterol, não sendo identificado quando há a hipercolesterolemia associada com o aumento plasmático de fitosteróis. No caso da dosagem de fitosterol, somente a solicitação de exames mais específicos, como a GC-MS, permite a quantificação desse esterol.

Desse modo, a inclusão dos genes de STSL em painel genético para HF se mostrou eficiente na identificação de pacientes sitosterolêmicos, e revela que a STSL pode estar presente em coorte de hipercolesterolêmicos, cuja a hipótese diagnóstica principal ser a HF. Ambas as doenças possuem causas genéticas distintas, porém podem levar a fenótipos semelhantes, entretanto, o tratamento tanto medicamentoso quanto nutricional podem ser melhor direcionado, melhorando o prognóstico desses pacientes.

A conclusão da inclusão dos genes de STSL em painel genético para HF resultou no aceite do artigo “*Rastreamento dos genes ABCG5 e ABCG8 de Sitosterolemia em um Programa de Rastreamento em Cascata de Hipercolesterolemia Familiar*” para publicação e está disponível no Apêndice C.

7. Conclusões

A análise dos genes *APOE* e *STAP1* para HF permitiu a identificação de 10 pacientes portadores de variante de significado incerto, sendo 7 no gene *APOE* e 3 no gene *STAP1*. O gene *APOE* parece contribuir significativamente em casos de HF e deve continuar sendo investigada em casos de hipercolesterolemia. Já com relação ao gene *STAP1*, estudos demonstram que os níveis de CT e LDL-C não são diferentes entre portadores e não-portadores, e a hipercolesterolemia não é acompanhada pela presença da variante, evidenciando que as variantes no gene *STAP1* não co-segregam nas famílias analisadas. Além disso, estudos envolvendo modelos animais não encontraram diferença significativa na expressão e internalização de partículas de LDL. Desse modo, o gene *STAP1* parece não estar associado à Hipercolesterolemia Familiar.

Através da análise dos genes *ABCG5* e *ABCG8* foi possível identificar 9 variantes distintas, confirmando a STSL em 7 CIs, e pela análise familiar, foi possível a identificação de 6 familiares adicionais, totalizando 13 pacientes com STSL. A inclusão dos genes de STSL no painel genético do programa de rastreamento genético em cascata de HF permitiu o preciso diagnóstico em um número substancial de pacientes, evidenciando a importância da inclusão dos genes de STSL.

A utilização dos critérios da ACMG permitiu a análise sistemática das variantes raras encontradas, e a co-segregação familiar tem permitido a melhor interpretação do papel da variante na família.

8. Sugestão para trabalhos futuros

Realizar a análise de co-segregação familiar de variantes VUS no gene *APOE* em um número maior de portadores para avaliar o padrão de segregação da variante. Realizar a dosagem de colesterol e avaliação clínica para investigação de aterosclerose.

Realizar o *follow-up* de pacientes com STSL confirmada afim de avaliar a evolução clínica desses pacientes.

9. Anexos

9.1. Anexo A

Primers utilizados para a amplificação por PCR

Gene	Exon	Variante	Forward	Reverse	Tamanho
<i>ABCG5</i>	1	p.(Gln22*)	5'-CTCCCCAACTGAAGCCACT-3'	5'-GTGAAGAAAGGCAGCAGAGG-3'	293bp
<i>ABCG5</i>	13	p.(Phe630fs*8)	5'-GCGCTTGGTAAATACTTGTTGA-3'	5'-TGGCACTCTCATTTCAGACG-3'	348bp
<i>ABCG8</i>	7	p.(Trp361*)	5'-AAGTGCATCGCTACCCTTGT-3'	5'-GGTGTCCATCCAGGCAGAAGT-3'	261bp
<i>ABCG8</i>	9	p.(Arg412*), p.(Arg389His), p.(Arg389Cys)	5'-TAGCCATCCCCCAATAACAA-3'	5'-TTACAGCTGGAGAAGGGAGGT-3'	328bp
<i>ABCG8</i>	10	p.(Tyr492*)	5'-GCCCTGACAGACCTCACATT-3'	5'-CCCCTAGCTCCATGACTCC-3'	290bp
<i>ABCG8</i>	2	c.1212-1 G>C	5'-GGGCACAGGTAGGATCAATG-3'	5'-TCAAACCTGTGGCTTTCTTGT-3'	309bp
<i>ABCG8</i>	12	p.(Ser609Thrfs*54)	5'-TGGTAGGACTATTGCCAGAGC-3'	5'-CCTCCAAGAAATTGCTTCCTC-3'	232bp

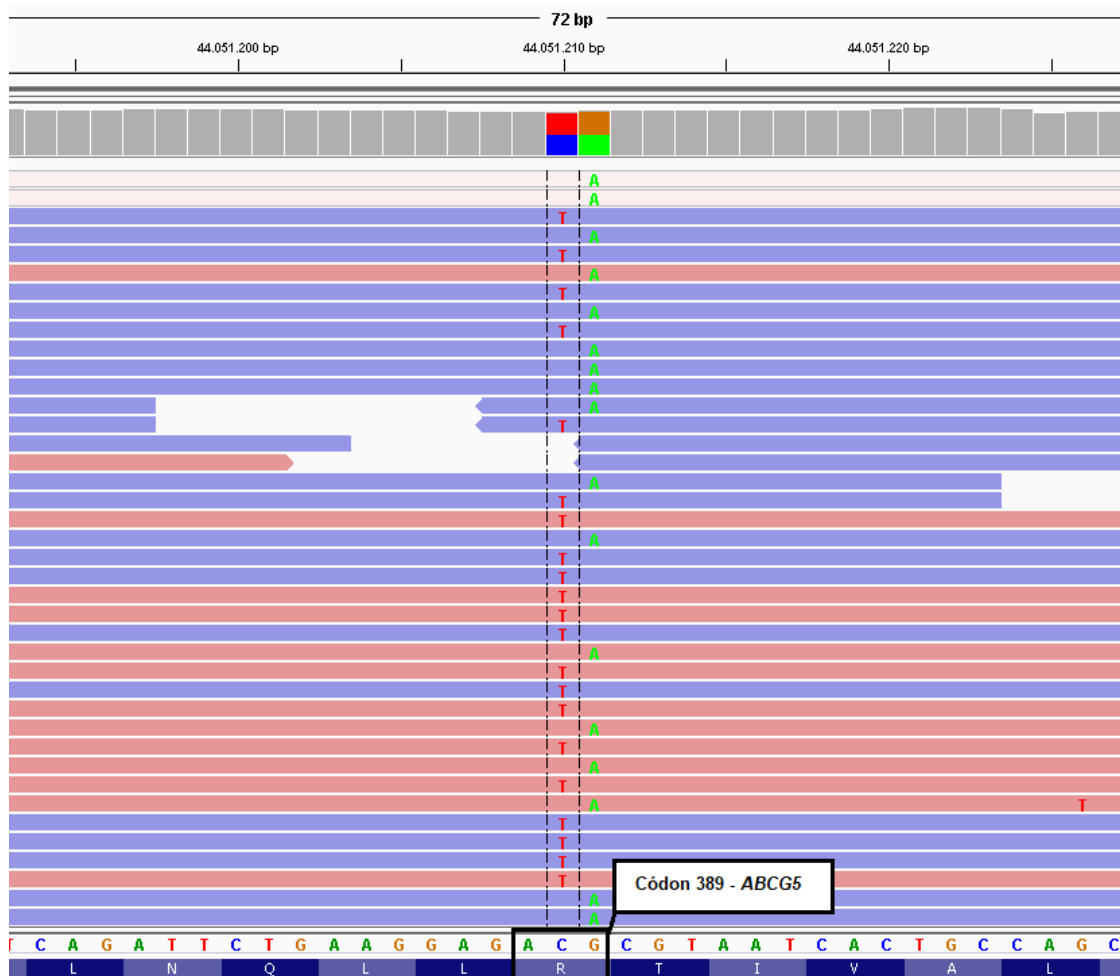
9.2. Anexo B

Características clínicas e bioquímicas adicionais

Indivíduo	Zigossidade/ Tipo de variante	Lp(a) mg/dL	ApoA1 g/L	ApoB g/L	Escore CAC	TCP/ MTCP/ anemia	Alteração morfológica do eritrócito
A-II:1*	HMZ/ $\alpha\alpha$	11,80	1,40	1,58	.	-/-/-	-
A-II:3	HMZ/ $\alpha\alpha$	3,59	.	1,21	.	+/-/-	-
B-II:2*	CHT/ $\alpha\beta$	104,00	1,52	1,20	111,56	+/-/+	-
C-II:1*	CHT/ $\alpha\alpha$	+/+/+	Anisocitose Policromasia
D-II:2*	CHT/ $\alpha\gamma$	-/-/+	Microcitose
D-II:1	CHT/ $\alpha\gamma$	-/-/-	-
E-II:3*	HMZ/ $\alpha\alpha$	41,1	.	0,95	.	+/-/+	Anisocitose
E-II:2	HMZ/ $\alpha\alpha$	+/+/-	Anisocitose Policromasia
F-II:1*	CHT/ $\alpha\gamma$	24,6	.	2,22	114,00	-/-/-	Anisocitose
G-II:3*	CHT/ $\delta\delta$	+/-/-	-
G-II:1	CHT/ $\delta\delta$/./.	.
G-II:2	CHT/ $\delta\delta$	-/-/-	-
G-I:1	HMZ/ $\delta\delta$	+/-/-	-
H-II:1*	./ $\alpha\gamma$	-/-/-	-

* Caso índice. HMZ: homozigoto. HCT: heterozigoto compost em trans; α : nonsense; β : sítio de splicing; γ : pequena deleção; δ : missense; Lp(a): lipoprotein(a) (Referência: até 30.0 mg/dL); ApoA1: apolipoprotein A1 (Referência: 1.1-2.05 g/L); ApoB: apolipoprotein B (Referência: 0.55-1.25 g/L); CAC: escore de cálcio da artéria coronária (método Agatston). traço: ausência da característica. ponto: sem informação. TCP: trombocitopenia; MTCP: macrotrombocitopenia.

9.1. Anexo C



Presença das variantes p.(Arg389His) e p.(Arg389Cys) no gene *ABCG5* encontradas no aminoácido 389 em *reads* separados, confirmando a presença da heterozigose composta em trans.

9.2. Anexo D

Table I – Características clínicas e laboratoriais dos portadores de variantes de perda de função nos genes *ABCG5/ABCG8*

Indivíduo	Grupo	Idade	Histórico Familiar de DAC	Xantoma/ Xantelasma		Manifestor subclínical ASCVD			LDL-C mg/dL			β-Sitosterol µg/mL	Campesterol µg/mL	CAC escore	Alterações hematológicas
				Presença	Idade	Presença	Idade	Atual	Menor	Maior					
I	HF negativo	45	Sim	Não/Não	-	Sim/mfst	44	360 ⁽⁰⁾	360 ⁽⁰⁾	360 ⁽⁰⁾	4.94 ⁽⁰⁾	1.02 ⁽⁰⁾	-	-	
J	HF negativo	31	Não	Não/Não	-	Não	-	114 ⁽¹⁾	114 ⁽¹⁾	259 ⁽⁰⁾	-	-	0	No	
K	HF negativo	39	Sim	Não/Não	-	Não	-	254 ⁽⁰⁾	254 ⁽⁰⁾	254 ⁽⁰⁾	-	-	-	-	
L	HF negativo	54	Sim	Não/Não	-	Sim/subclínico	-	184 ⁽¹⁾	120 ⁽¹⁾	238 ^(1,2)	1.76 ⁽¹⁾	0.86 ⁽¹⁾	457	No	
M	HF positivo* p.(Asp.221Gly)	13	-	Não/Não	-	Não	-	239 ⁽⁰⁾	239 ⁽⁰⁾	239 ⁽⁰⁾	-	-	-	-	
N	HF positivo* c.-135>G	29	Não	No/No	-	Não	-	216 ⁽⁰⁾	216 ⁽⁰⁾	280 ⁽⁰⁾	-	-	-	-	

As alterações hematológicas consistem na presença de trombocitopenia, macrotrombocitopenia, anemia e/ou pela presença de alteração da morfologia eritrocitária. Mfst: manifesta. Subclínico: subclínica. 0: baseline; 1: atorvastatina; 2: ezetimiba. CAC escore: escore de cálcio de artéria coronária (método Agatston). Nenhum desses CIs tiveram ultrassom abdominal ou de carótidas realizada. *: portador de variante patogênica ou provavelmente patogênica.

9.3. Anexo E

Table II – Variantes encontradas nos genes *ABCG5* e *ABCG8* em heterozigose

Gene	Variante	Tipo de variante	Indivíduo	Predição <i>in silico</i>	gnomAD	ABraOM	Kaviar	Literatura médica	Critério ACMG	Classificação ACMG
<i>ABCG5</i>	p.(Gln22*) c.64C>T	Nonsense	I, M	Deletéria	0,00004456	-	0,000071	Su (2006)	PVS1, PP5, PM2	Patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Trp361*) c.1083G>A	Nonsense	N	Deletéria	0,0009374	-	0,000998	Berge KE et al (2000)	PVS1, PP4, PP5	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Arg446*) c.1166G>A	Missense	K	Deletéria	0,0001702	-	0,000129	Mannucci L (2007)	PVS1, PP5, PM2	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Phe630Leufs*8) c.1890delT	Pequena deleção	J	Deletéria	0,00001995	0,000821	0,000006	-	PVS1, PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Tyr658*) c.1974C>G	Nonsense	L	Deletéria	0,00002475	-	0,000019	-	PVS1, PP5, PM2	Patogênica

Variantes novas estão em negrito. Predição *in silico* de todas as alterações nonsense ou frameshift foram feitas utilizando o programa Mutation Taster. Variantes missenses foram preditas utilizando os programas Provean, SIFT, PolyPhen-2 e Mutation Taster. A presença de publicações científicas foram pesquisadas nos banco de dados Pubmed, ClinVar, LOVD e HGMD.

9.4. Anexo F

Table III – Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas encontradas no banco de dados UK Biobank

Gene	Variante	Nº de portadores	Tipo de variante	Predição <i>in silico</i>	ABraOM	Literatura médica	Critério ACMG	Classificação ACMG
<i>ABCG8</i>	p.(Thr16Leufs*76) c.45delC	3	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Tyr54*) c.162C>A	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Arg19*) c.55A>T	10	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Trp64*) c.192G>A	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Tyr45*) c.135C>G	6	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Lys94*) c.280A>T	2	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Trp54Leufs*144) c.159dupC	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln99Argfs*6) c.294delG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Ser107*) c.320C>G	8	Nonsense	Deletéria	-	ClinVar VCV000039520	PVS1 PM2 PP5	Patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Arg121*) c.361C>T	2	Nonsense	Deletéria	-	PubMed 11452359	PVS1 PM2 PP5	Patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln137Serfs*8) c.408delG	2	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln156*) c.466C>T	3	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Gln63*) c.187C>T	4	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Arg164*) c.490C>T	4	Nonsense	Deletéria	0.000821	PubMed 11452359	PVS1 PM2 PP5	Patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Glu217*) c.649G>T	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Trp64*) c.192G>A	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Tyr75*) c.225C>G	10	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica

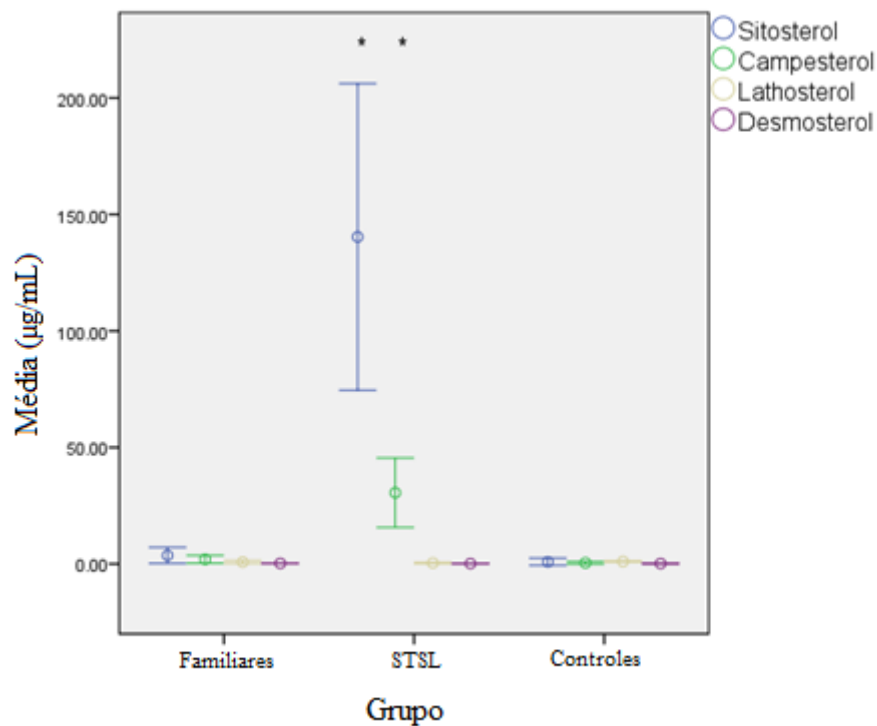
<i>ABCG5</i>	p.(Ser88*) c.263C>A	6	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Ser268Profs*18) c.801delC	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln271*) c.811C>T	4	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Ile292Serfs*3) c.873delC	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln302*) c.904C>T	12	Nonsense	Deletéria	-	ClinVar VCV000972743	PVS1 PM2 PP5	Patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Val322Met) c.964G>A	3	Missense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2 PP3	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Gly89Ser) c.265G>A	2	Missense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2 PP3	Patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln343*) c.1027C>T	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Ala346Glyfs*10) c.1036dupG	2	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Ser376Thr) c.1127G>C	10	Missense	Tolerado	-	-	PVS1 PM2 BP4	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Gly89Ala) c.266G>C	2	Missense	Deletéria	-	ClinVar VCV000336054	PVS1 PM2 PP3	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Ala106Glyfs*91) c.317_318delCG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Pro387Leufs*14) c.1160_1166delCGAGTCC	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Arg404Ser) c.1210C>A	1	Missense	Tolerado	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Thr108Profs*8) c.321delG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Arg404His) c.1211G>A	3	Missense	Tolerado	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Arg404Leu) c.1211G>T	1	Missense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2 PP3	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Glu112Argfs*4) c.334delG	2	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Arg405Cys) c.1213C>T	10	Missense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2 PP3	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Ala119Profs*80) c.351_354dupCCGG	4	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln406*) c.1216C>T	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Leu138Cysfs*2) c.412delC	3	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica

<i>ABCG8</i>	p.(Ser428*) c.1283C>G	4	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Glu146*) c.436G>T	9	Nonsense	Deletéria	-	PubMed 16029460	PVS1 PM2 PP5	Patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Lys167Met) c.500A>T	2	Missense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2 PP3	Patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Arg183*) c.547C>T	11	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Gln442*) c.1324C>T	6	Nonsense	Deletéria	-	PubMed 17228349	PVS1 PM2 PP5	Patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Gly192Alafs*35) c.575delG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Ile193Hisfs*5) c.575dupG	12	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Cys471Phe) c.1412G>T	1	Missense	Tolerado	-	-	PVS1 PM2 BP4	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Arg200Profs*13) c.596dupG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Lys212Glu) c.634A>G	1	Missense	Tolerado	-	ClinVar VCV001163707	PVS1 PM2	Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Gln251*) c.751C>T	2	Nonsense	Deletéria	-	ClinVar VCV001120119	PVS1 PM2 PP5	Patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Lys320*) c.958A>T	6	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Ser473*) c.1418C>A	3	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Tyr479*) c.1437C>G	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Tyr329*) c.987C>A	1	Nonsense	Deletéria	-	PubMed 20521169	PVS1 PM2 PP5	Patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Leu482Trpfs*40) c.1444delC	12	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Gly369Valfs*4) c.1106delG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Val380*) c.1138delG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Leu401Phefs*94) c.1201_1202delCT	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Tyr487Thrfs*35) c.1458delG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente patogênica
<i>ABCG8</i>	p.(Pro491Serfs*111) c.1469dupG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica
<i>ABCG5</i>	p.(Arg408*) c.1222C>T	7	Nonsense	Deletéria	-	ClinVar VCV000004976	PVS1 PM2 PP5	Patogênica

ABCG5	p.(Tyr458*) c.1374C>G	2	Nonsense	Deletéria	-	ClinVar VCV000808732	PVS1 PM2 PP5	Patogênica
ABCG8	p.(Tyr492*) c.1476T>A	4	Nonsense	Deletéria	-	PubMed 24657386	PVS1 PM2 PP5	Patogênica
ABCG8	p.(Lys496Met) c.1487A>T	8	Missense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2 PP3	Patogênica Provavelmente
ABCG8	p.(Arg522Serfs*56) c.1566delG	2	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(Gln459*) c.1375C>T	2	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica
ABCG5	p.(Trp488Arg) c.1462T>C	5	Missense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2 PP3	Patogênica
ABCG5	p.(Arg498*) c.1492C>T	8	Nonsense	Deletéria	-	ClinVar VCV000500318	PVS1 PM2 PP5	Patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(His510Profs*5) c.1528dupC	6	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(Gly545Aspfs*32) c.1634delG	2	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(Glu610Glyfs*13) c.1829delA	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(Ser629*) c.1886C>G	51	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG8	p.(Gln526*) c.1576C>T	1	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(Phe630Leufs*8) c.1890delT	2	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica
ABCG8	p.(Trp536*) c.1608G>A	4	Nonsense	Deletéria	-	ClinVar VCV000499930	PVS1 PM2 PP5	Patogênica Provavelmente
ABCG8	p.(Trp584*) c.1752G>A	11	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG8	p.(Tyr613Phefs*51) c.1836_1837dupTT	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG8	p.(Lys628*) c.1882A>T	2	Nonsense	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(His647Leufs*22) c.1940delA	1	Frameshift	Tolerado	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG8	p.(Ser670Argfs*60) c.2010_2014delTCAAG	1	Frameshift	Deletéria	-	-	PVS1 PM2	patogênica Provavelmente
ABCG5	p.(*652Lysext*1) c.1954T>A	1	Frameshift	Tolerado	-	-	PVS1 PM2	patogênica

Predição *in silico* de todas as alterações nonsense ou frameshift foram feitas utilizando o programa Mutation Taster. Variantes missenses foram preditas utilizando os programas Provean, SIFT, PolyPhen-2 e Mutation Taster. A presença de publicações científicas foram pesquisadas nos banco de dados Pubmed, ClinVar, LOVD e HGMD.

9.5. Anexo G



Distribuição dos esteróis de acordo com o genótipo. Familiares: todos heterozigotos. STSL: homozigotos ou heterozigoto composto em trans. Controles: pool controle com 6 indivíduos saudáveis, sem hipercolesterolemia ou qualquer outra doença conhecida. O grupo STSL apresentou um aumento significativo das concentrações de sitosterol e campesterol quando comparado com seus familiares e controles ($p < 0,01$). Lathosterol e demonsterol não apresentou diferença significativa entre os grupos. μ

10. Referências bibliografia

1. Futema M, Plagnol V, Li K, Whittall RA, Neil HAW, Seed M, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for *LDLR* / *APOB* / *PCSK9* mutations. *J Med Genet* [Internet]. 2014;51(8):537–44. Available from: <http://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2014-102405>
2. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humpries SE. Familial Hypercholesterolemia and Coronary Heart Disease: A HuGE Association Review. *Am J Epidemiol*. 2004;160(5):421–9.
3. Santos R, Gagliardi A, Xavier H, Filho A, Araújo D, Cesena F, et al. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(2):1–28.
4. Brautbar A, Leary E, Rasmussen K, Wilson DP, Steiner RD, Virani S. Genetics of Familial Hypercholesterolemia. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(4).
5. Jannes CE, Santos RD, Silva PR, Turolla L, Gagliardi ACM, Marsiglia JDC, et al. Familial hypercholesterolemia in Brazil: Cascade screening program, clinical and genetic aspects. 2015;238:101–7.
6. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Seventh. New York; 1995.
7. Hu P, Dharmayat KI, Stevens CAT, Sharabiani MTA, Jones RS, Watts GF, et al. Prevalence of Familial Hypercholesterolemia among the General Population and Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation*. 2020;1742–59.
8. Khera A V., Hegele RA. What Is Familial Hypercholesterolemia, and Why Does It Matter? *Circulation*. 2020;141(22):1760–3.
9. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemistry* [Internet]. New York. 2017 [cited 2017 Jul 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BOOKS/NBK22339/>
10. Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. Colesterol e triglicérides [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 14]. Available from: <http://socerj.org.br/>
11. Pitanga FJG. Atividade física e lipoproteínas plasmáticas em adultos de ambos os sexos: Physical activity and plasmatics lipoproteins in adults male and female. 2001;9(4):25–31.
12. WHO. WHO. The top 10 causes of death [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 24]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

13. Corrêa-camacho CR, Dias-melicio LA, Soares ÂMVC. Aterosclerose , uma resposta inflamatória Atherosclerosis , an inflammatory response. 2007;14(1):41–8.
14. Alves AC dos S. Base Genética da Hipercolesterolemia Familiar. Tese [Doutorado em Bioquímica - Especialidade em Genética Molecular]. Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências; 2014.
15. Marks D, Wonderling D, Thorogood M, Lambert H. Hypercholesterolaemia: Screening vs Case Finding. 2000;4(29).
16. Hopkins PN. Putting Into Perspective the Hazards of Untreated Familial Hypercholesterolemia. J Am Heart Assoc. 2017;1.
17. Santos RD, Mata P, Stoll M. Hipercolesterolemia Familiar. 1st ed. São Paulo; 2015. 143 p.
18. Graham CA, Latten MJ, Hart PJ. Molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia. 2017;44(1):1–13.
19. DeGoma EM, Ahmad ZS, O'Brien EC, Kindt I, Shrader P, Newman CB, et al. Treatment Gaps in Adults With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia in the United States Data From the CASCADE-FH Registry. 2016;9(3):240–9.
20. Brautbar A, Leary E, Rasmussen K, Wilson DP, Steiner RD, Virani S. Genetics of Familial Hypercholesterolemia. Current Atherosclerosis Reports. 2015. p. 2–17.
21. Martin R, Latten M, Hart P, Murray H, Bailie DA, Crockard M, et al. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia using a rapid biochip array assay for 40 common LDLR, APOB and PCSK9 mutations. Atherosclerosis [Internet]. 2016;254:8–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.09.061>
22. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic Causes of Monogenic Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: A HuGE. 2004;160(5):407–20.
23. Associação Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar - AHF. O que é [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 14]. Available from: <http://www.ahfcolesterol.org>
24. Aken BL, Ayling S, Barrell D, Clarke L, Curwen V, Fairley S, et al. The Ensembl gene annotation system. Database [Internet]. 2016; Available from: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/baw093/2630475/The-Ensembl-gene-annotation-system>
25. Jeon H, Blacklow SC. Structure and Physiologic Function of the Low-Density Lipoprotein Receptor. Annu Rev Biochem [Internet]. 2005;74(1):535–62. Available from:

- <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133354>
26. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1987;84(19):6919–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=299196&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 27. Calandra S, Tarugi P, Bertolini S. Impact of rare variants in autosomal dominant hypercholesterolemia causing genes. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2017;28(3):267–72. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00041433-900000000-99500>
 28. Defesche JC. Jojo Genetics Database. Available from: <http://www.jojogenetics.nl/wp/database/>
 29. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Internet]. 1988 [cited 2017 Aug 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 30. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, et al. A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2006;7878(March):410–22. Available from: www.ajhg.org
 31. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JCM, Zelcer N, Kastelein JJP, Defesche JC, et al. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2014;115(6):552–5.
 32. Silva PRS, Jannes CE, Oliveira TGM, Miname MH, Rocha VZ, Chacra AP, et al. Evaluation of clinical and laboratory parameters used in the identification of index cases for genetic screening of familial hypercholesterolemia in Brazil. *Atherosclerosis*. 2017;263:257–62.
 33. Bourbon M, Alves AC, Medeiros AM, Silva S, Soutar AK. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis*. 2008;196(2):633–42.
 34. Futema M, Bourbon M, Williams M, Humphries SE. Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2018;277:457–63.
 35. Tada H, Nohara A, Kawashiri M. Monogenic, polygenic, and oligogenic familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2019;1. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00041433-900000000-99364>
 36. Marduel M, Ouguerram K, Serre V, Bonnefont-Rousselot D, Marques-Pinheiro A, Erik Berge K, et al. Description of a Large Family with Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Associated with the APOE p.Leu167del Mutation. *Hum*

- Mutat. 2013;34(1):83–7.
37. Wintjens R, Bozon D, Belabbas K, MBou F, Girardet J-P, Tounian P, et al. Global molecular analysis and APOE mutations in a cohort of autosomal dominant hypercholesterolemia patients in France. *J Lipid Res* [Internet]. 2016;57(3):482–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26802169><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4766997><http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.P055699>
 38. Khalil YA, Marmontel O, Ferri J, Paillard F, Yelnik C, Charri S, et al. APOE Molecular Spectrum in a French Cohort with Primary Dyslipidemia. 2022;
 39. Ojopi EPB, Bertoncini AB, Dias Neto E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. *Rev Psiquiatr Clínica* [Internet]. 2004;31(1):26–33. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-60832004000100005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 40. Forti N, Salazar LA, Diament J, Giannini SD, Hirata MH, Paulo S. Alterações Genéticas e Colesterolemia : Recentes Estudos Brasileiros. 2003;80(nº 5):565–71.
 41. Calandra S, Tarugi P, Speedy HE, Dean AF, Bertolini S, Shoulders CC. Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classification and disease risk. *J Lipid Res* [Internet]. 2011;52(11):1885–926. Available from: <http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.R017855>
 42. Blanco-vaca F, Martín-campos JM, Pérez A. A rare STAP1 mutation incompletely associated with familial hypercholesterolemia. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2018;487(October):270–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.014>
 43. Lamiquiz-Moneo I, Restrepo-Córdoba MA, Mateo-Gallego R, Bea AM, del Pino Alberiche-Ruano M, García-Pavía P, et al. Predicted pathogenic mutations in STAP1 are not associated with clinically defined familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [Internet]. 2020;292(July 2019):143–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.025>
 44. Day INM. FH4=STAP1. Another Gene for Familial Hypercholesterolemia? *Circ Res*. 2014;
 45. Civeira F. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [Internet]. 2004/06/05. 2004;173(1):55–68. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=15177124
 46. Philippa J Talmud*, Sonia Shah*, Ros Whittall, Marta Futema, Philip Howard, Jackie A Cooper, Seamus C Harrison, KaWah Li, Fotios Drenos, Frederik Karpe, H Andrew W Neil, Olivier S Descamps, Claudia Langenberg, Nicholas Lench,

- Mika Kivimaki, John Whittaker SEH. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet* [Internet]. 2013;381(9874):1302–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62127-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62127-8)
47. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem*. 2015;
 48. Paththinige C, Sirisena N, Dissanayake V. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia – a comprehensive literature review. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2017;16(1):103. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0488-4>
 49. Al-Allaf FA, Coutelle C, Waddington SN, David AL, Harbottle R, Themis M. LDLR-Gene therapy for familial hypercholesterolaemia: Problems, progress, and perspectives. *Int Arch Med*. 2010;3(1):1–25.
 50. Nair DR, Sharifi M, Al-Rasadi K. Familial hypercholesterolaemia. *Curr Opin Cardiol* [Internet]. 2014;29:381–8. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L53149629> <http://dx.doi.org/10.1097/HCO.0000000000000083>
 51. Buonomo PS, Iughetti L, Pisciotta L, Rabacchi C, Papadia F, Bruzzi P, et al. Timely diagnosis of sitosterolemia by next generation sequencing in two children with severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [Internet]. 2017;262(6):71–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28521186> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915017301910>
 52. Myrie S, Rouillet J-B, Sitosterolemia Foundation. Sitosterolemia [Internet]. Nation Organization for Rare Disorders. 2019. p. 1–8. Available from: <https://rarediseases.org/rare-diseases/sitosterolemia/>
 53. Bhattacharyya AK, Connor WE. β Sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest*. 1974;53(4):1033–43.
 54. Merkens LS, Myrie SB, Steiner RD, Mymin D. Sitosterolemia. *GeneReviews* [Internet]. 2012;1–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
 55. Huang D, Zhou Q, Chao Y-Q, Zou C-C. Clinical features and genetic analysis of childhood sitosterolemia. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(15):e15013.
 56. Plat J, Baumgartner S, Vanmierlo T, Lutjohann D, Calkins K, Burrin D. Plant-based sterols and stanols in health & disease: “Consequences of human development in a plant-based environment?” *Prog Lipid Res*. 2019;74:87–102.
 57. Escolà-Gil JC, Quesada H, Julve J, Martín-Campos JM, Cedó L, Blanco-Vaca F.

- Sitosterolemia: Diagnosis, investigation, and management. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(7).
58. Yoo E. Sitosterolemia : a review and update of pathophysiology , clinical spectrum , diagnosis , and management. 2016;1012:7–14.
 59. Berge KE. Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters. *Science* (80-) [Internet]. 2000;290(5497):1771–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5497.1771>
 60. Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS, Shore V. Sitosterolem ia. 1992;33:945–55.
 61. Zein AA, Kaur R, Hussein TOK, Graf GA, Lee JY. ABCG5/G8: A structural view to pathophysiology of the hepatobiliary cholesterol secretion. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(5):1259–68.
 62. Repa J. The liver X receptor gene team : 2002;8(11):1243–8.
 63. Tada H, Nohara A, Inazu A, Sakuma N, Mabuchi H, Kawashiri MA. Sitosterolemia, hypercholesterolemia, and coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(9):783–9.
 64. Colima Fausto AG, González García JR, Wong Ley Madero LE, Magaña Torres MT. Two novel mutations in the ABCG5 gene, c.144 -1G>A and c.1523 delC, in a Mexican family with sitosterolemia. *J Clin Lipidol.* 2016;10(1):204–8.
 65. Kojima N, Tada H, Usui S, Sakata K, Hayashi K, Nohara A, et al. Serum sitosterol level predicting ABCG5 or ABCG8 genetic mutations. 2020;
 66. Schumacher T, Benndorf RA. ABC Transport Proteins in Cardiovascular Disease—A Brief Summary. *Molecules* [Internet]. 2017;22(4):589. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/4/589>
 67. Hooper AJ, Bell DA, Hegele RA, Burnett JR. Clinical utility gene card for: Sitosterolaemia. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2017;25(4):1–3. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ejhg.2016.187>
 68. Shuto T. Inhibition of post-translational N- glycosylation by HRD1 that controls the fate of ABCG5/8 transporter. 2014;(March).
 69. Tada H, Okada H, Nomura A, Takamura M, Kawashiri MA. Beneficial effect of ezetimibe-atorvastatin combination therapy in patients with a mutation in ABCG5 or ABCG8 gene. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):1–7.
 70. Jannes CE, Silvino JPP, Silva PR de S, Lima IR, Tada MT, Oliveira TGM, et al. Screening for Familial Hypercholesterolemia in Small Towns: Experience from 11 Brazilian Towns in the Hipercolbrasil Program. *Arq Bras Cardiol.*

2022;118(4):669–77.

71. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* [Internet]. 2015;17(5):405–23. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/gim.2015.30>
72. Nunes VS, Leança CC, Panzoldo NB, Parra E, Cazita PM, Nakandakare ER, et al. HDL-C concentration is related to markers of absorption and of cholesterol synthesis: Study in subjects with low vs. high HDL-C. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2011;412(1–2):176–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.09.039>
73. Hegele RA, Knowles JW, Horton JD. Delisting STAP1: The rise and fall of a putative hypercholesterolemia gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;(April):847–9.
74. Loaiza N, Hartgers ML, Reeskamp LF, Balder JW, Rimbert A, Baziotti V, et al. Taking one step back in familial hypercholesterolemia: STAP1 does not alter plasma LDL (Low-Density Lipoprotein) cholesterol in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;(April):973–85.
75. Bao L, Li Y, Deng SX, Landry D, Tabas I. Sitosterol-containing lipoproteins trigger free sterol-induced caspase-independent death in ACAT-competent macrophages. *J Biol Chem*. 2006;281(44):33635–49.
76. Bastida JM, Benito R, González-porras JR, Rivera J, Bastida JM. ABCG5 and ABCG8 gene variations associated with sitosterolemia and platelet dysfunction platelet dysfunction. *Platelets* [Internet]. 2020;00(00):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1779926>

11. Apêndices

11.1. Apêndice A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Dados da pesquisa:

Título da pesquisa : Programa Genético de Rastreamento Ativo de Hipercolesterolemia Familiar **no Brasil**

Pesquisador principal : Prof. José Eduardo Krieger

Pesquisador Executante: Dr. Alexandre da Costa Pereira

Coordenadora: Cinthia Elim Jannes Lepski

Departamento/Instituto: Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - Instituto do Coração – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP

De acordo com a resolução [466/2012](#) os seguintes conteúdos devem fazer parte das explicações sobre a pesquisa.

II. Descrição e objetivo da pesquisa:

Você é convidado a participar de um estudo de rastreamento genético em cascata para hipercolesterolemia familiar. Será efetuada coleta de sangue ou saliva para posterior análise do seu DNA para verificação da presença ou ausência de alteração genética correlacionada com hipercolesterolemia familiar. Quando o resultado ficar pronto entraremos em contato com o(a) senhor(a) para entregarmos o laudo. Caso a alteração seja encontrada, todos seus familiares serão convocados para coleta e da mesma forma, faremos a busca da alteração no DNA deles.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE 3ª versão de 05/05/2016

III. Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados:

A obtenção de DNA do paciente poderá ser realizada de três formas:

Coleta de sangue

- Não é necessário estar em jejum

- Será efetuada coleta de 8 mL de sangue em tubo com EDTA e 10 mL de sangue em tubo sem anticoagulante. A coleta deve seguir todas as normas de higiene e segurança estabelecidas para este fim e será efetuada por profissionais enfermeiros treinados e participantes do projeto.

Coleta de saliva:

- Não é necessário estar de jejum

- A coleta de 2 ml de saliva será realizada em tubo específico contendo líquido estabilizador. As instruções de coleta a serem realizadas pelo paciente serão enviados juntamente com o Kit de coleta.

Coleta de sangue em papel filtro:

- Não é necessário estar de jejum

- Coleta de 4 gotas de sangue em papel filtro FTA após perfuração do dedo com lanceta específica após esterilização com álcool 70%. As instruções de coleta a serem realizadas pelo paciente serão enviados juntamente com o Kit de coleta.

IV. Riscos e benefícios esperados:

Riscos: Risco mínimo.

Benefícios esperados para o participante: realização de teste genético para Hipercolesterolemia Familiar, ajudando assim no diagnóstico e tratamento da doença.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE 3ª versão de 05/05/2016

V. Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre garantias do sujeito da pesquisa consignado

- 1 Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa identificar pessoas com alteração genética causadora de hipercolesterolemia familiar;
- 2 **Você pode, a qualquer momento, fazer a retirada do consentimento, ou seja, você pode desistir do estudo em qualquer momento sem que haja qualquer prejuízo.**
- 3 **Direito de confidencialidade: para manter sua privacidade, será fornecido um número de registro à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido no mais absoluto sigilo e não será divulgado em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.**
- 4 Os participantes serão beneficiados por terem a identificação ou não de uma alteração genética e poderão auxiliar e beneficiar os familiares, que muitas vezes não sabem que possuem a doença e estão sem acompanhamento médico. Encaminharemos os indivíduos que apresentarem alterações nos exames coletados para tratamento e acompanhamento no sistema público de saúde **da sua região**. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
- 5 **Os pacientes que concordarem em participar do projeto deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.**
- 6 **Você assinará as duas vias do termo de consentimento livre esclarecido de igual teor e receberá por direito uma das vias para controle pessoal.**
- 7 Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Prof. José Eduardo Krieger** que poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, nº 44, andar AB. Telefone: 11 2661-5579. Se o Sr.(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel:(11)2661-7585/ (11)2661 1548 (11)2661 1549 FAX: 2661-6442– E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br
- 8 É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 9 Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
- 10 Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE 3º versão de 05/05/2016

12 O material coletado será processado e armazenado em banco/repositório do InCor. O mesmo será utilizado para sequenciamento de DNA e identificação da presença de mutação e dosagem dos níveis de colesterolis. Após os testes, o DNA será mantido no banco/repositório para identificações futuras de novas mutações e para futuros estudos envolvendo este ou outro projeto relacionado à Hipercolesterolemia Familiar. O material será mantido no banco/repositório durante os três anos de vigor do Projeto, mas este prazo poderá ser maior caso o Projeto seja renovado.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com o Prof. José Eduardo Krieger ou Dra. Cinthia Elim Jannes ou as enfermeiras do programa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Programa Genético de Rastreamento Ativo de Hipercolesterolemia Familiar no Brasil

2. PESQUISADOR: Prof. José Eduardo Krieger

NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 61539

CARGO/FUNÇÃO: Diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

Pesquisador Executante: Dr. Alexandre da Costa Pereira

NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 97329

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador executante

Pesquisador: Dra. Cinthia Elim Jannes Lepski

CARGO/FUNÇÃO: Coordenadora

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração – Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 10 anos

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

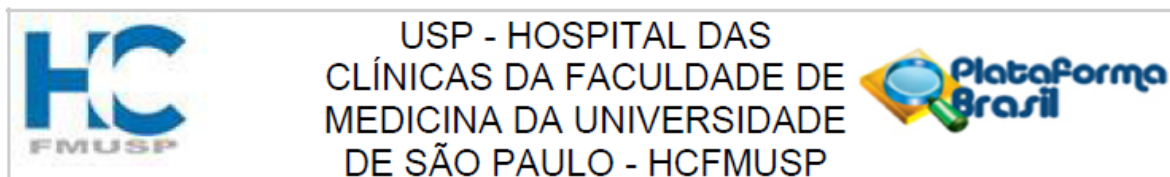
Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE 3º versão de 05/05/2016

rubrica responsavel pelo projeto:
TCLE 3º versão de 05/05/2016

11.1. Apêndice B

Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Programa Genético de Rastreamento Ativo de Hipercolesterolemia Familiar na População Brasileira

Pesquisador: Jose Eduardo Krieger

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 10

CAAE: 00594212.0.1001.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO SAMARITANO
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO PARECER

Apresentação do Projeto:

Apresentação da Emenda:

Emenda referente ao projeto nº CAAE: 00594212.0.1001.0068.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da emenda: Inclusão dos subprojetos e respectivos executantes: 1- "Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9" - MAURÍCIO TERUO TADA; 2- "Hipercolesterolemia poligênica: cálculo de escore genético de alelos de risco em pacientes com LDL elevado" - ISABELLA RAMOS LIMA - OBJETIVOS DOS SUBPROJETOS SUPRACITADOS: Objetivos Subprojeto 1:- Analisar os genes STAP1 e APOE para a investigação de variantes genéticas que possam estar relacionadas à hipercolesterolemia familiar e analisar os genes ABCG5 e ABCG8 como diagnóstico diferencial para sitosterolemia; - Verificar se as alterações encontradas estão descritas na literatura médica e se possuem relação com a hipercolesterolemia familiar.- Investigar se pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para HF possuem sitosterolemia, pesquisa feita através da investigação de variantes patogênicas nos genes ABCG5 e ABCG8.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

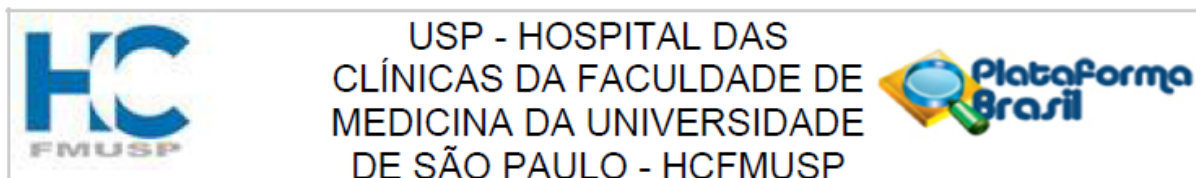
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.942

- Avaliar a frequência das variantes encontradas através da comparação de populações controles disponíveis.- Verificar qual isoforma do gene APOE é mais frequente em pacientes hipercolesterolêmicos brasileiros e comparar com a literatura internacional vigente.- Avaliar a predição do efeito de variantes provavelmente patogênicas na estrutura e função de proteínas, assim como avaliar a conservação entre as espécies utilizando softwares de bioinformática.Realizar co-segregação familiar de variantes provavelmente patogênicas através do sequenciamento dos familiares pela metodologia de Sanger. Objetivos subprojeto 2: - Analisar 12 SNPs associados ao aumento do LDL-C e realizar cálculo de escore genético em pacientes com ou sem mutação associada à HF, visando o diagnóstico da hipercolesterolemia poligênica- Validar o escore genético reportado na literatura científica em pacientes com diagnóstico clínico de HF previamente genotipados, comparando-os com um grupo controle.- Investigar e comparar a aplicabilidade do escore genético para hipercolesterolemia poligênica com 12 ou 6 SNPs.- Avaliar a influência dos SNPs relacionados aos três principais genes que causam a HF (LDLR, APOB e PCSK9) no escore genético, uma vez que estes podem estar em desequilíbrio de ligação com mutações não identificadas.- Investigar a influência do escore de risco poligênico em pacientes com mutação identificada para HF.

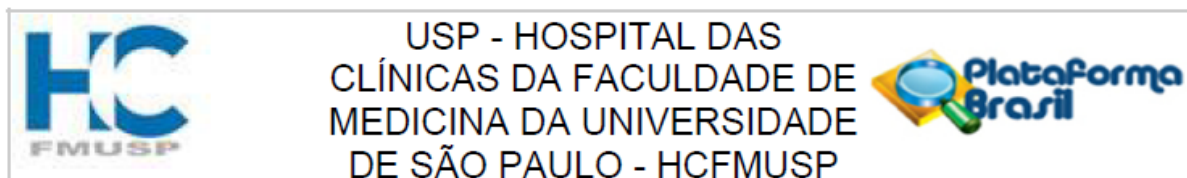
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios dos subprojetos inseridos na presente emenda: Mantidos quando comparados ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS SUBPROJETOS SUBMETIDOS NESTA EMENDA:1- Quanto ao subprojeto "Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9", será analisado o gene APOE em cerca de 500 pacientes não relacionados e que possuem diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9. Será investigado se as variantes genéticas encontradas podem estar relacionadas à HF. Também serão analisados os genes APOE, STAP1, ABCG5 e ABCG8 em cerca de 300 pacientes não relacionados e que também possuem diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9. Os critérios de seleção estão bem descritos, para ambos os grupos. Quanto ao material biológico, o pesquisador informa que foram captados através do programa de rastreamento genético em cascata de hipercolesterolemia familiar – Hipercol Brasil, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração de São Paulo.Quanto ao sequenciamento genético, a metodologia está detalhadamente descrita no projeto.2- Quanto

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.942

ao subprojeto "Hipercolesterolemia poligênica: cálculo de escore genético de alelos de risco em pacientes com LDL elevado", serão analisados 600 pacientes previamente consentidos, participantes do programa Hipercol Brasil. Caso alguma alteração patogênica seja identificada, o programa realiza o rastreamento em cascata nos familiares do indivíduo com diagnóstico molecular de HF. Quanto aos SNPs selecionados, reportados na literatura, estão todos descritos na brochura do subprojeto. Quanto à metodologia de análise dos genótipos está adequadamente descrita.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE subprojeto "Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9" adequado. TCLE subprojeto "Hipercolesterolemia poligênica: cálculo de escore genético de alelos de risco em pacientes com LDL elevado" adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada, sem objeções.

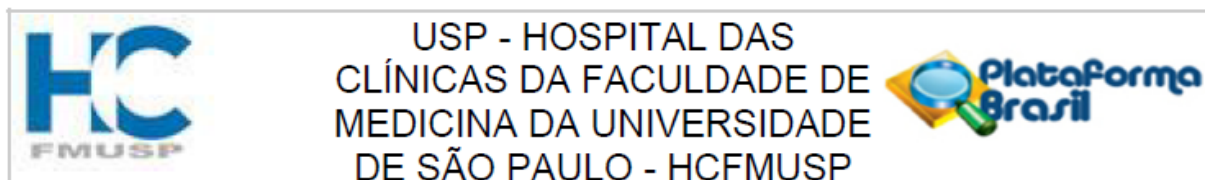
Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1443220_E5.pdf	26/09/2019 17:41:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_infantil_isabella.doc	26/09/2019 17:38:55	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_isabella.doc	26/09/2019 17:38:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.942

Justificativa de Ausência	TCLE_isabella.doc	26/09/2019 17:38:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Subprojeto_Isabella.docx	26/09/2019 17:38:00	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	ORCAMENTO_Isabella.docx	26/09/2019 17:37:22	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Declaracaodematrícula_janus.pdf	26/09/2019 17:36:59	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	CRONOGRAMA_Isabella.docx	26/09/2019 17:36:25	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	carta_sub_ISABELA.pdf	26/09/2019 17:36:13	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SUBPROJETO_MAUICIO.doc	26/09/2019 17:35:44	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MAUICIO INFANTIL.doc	26/09/2019 17:34:24	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	DECL_MATRICULA.pdf	26/09/2019 17:33:53	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Cronograma_MAUICIO.docx	26/09/2019 17:33:19	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	carta_sub_MAUICIO.pdf	26/09/2019 17:32:54	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	REL_PARCIAL.doc	26/09/2019 17:32:24	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SUBPROJETO_corrigido_19_07_18.docx	03/09/2018 08:58:29	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Parecer Anterior	aprovado_HIPERCOL_PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO CEP 66159.pdf	12/06/2018 17:19:35	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Carta_de_inclusao_de_subprojeto_2018_02_03_signed.pdf	07/03/2018 17:27:12	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj_Hipercol_Pop_Brasileira_versao_3.pdf	07/03/2018 17:23:17	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Formulario_para_submissao_de_emenda_e_brochura_2018_02_03_signed.pdf	07/03/2018 17:23:05	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Carta_parceria_unicamp.pdf	07/03/2018 17:22:06	Jose Eduardo Krieger	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

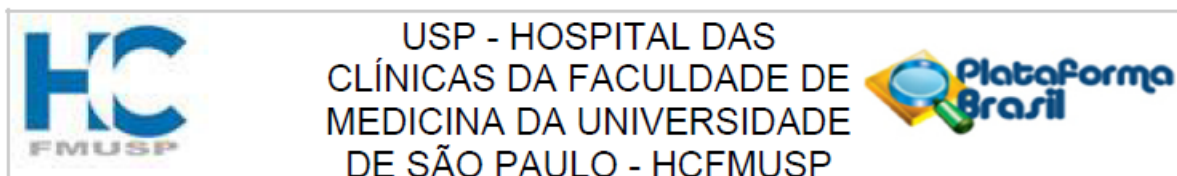
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.942

Outros	Carta_de_emenda_e_inclusao_de_pesquisador_2018_02_03_signed.pdf	07/03/2018 17:21:39	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Cronograma	Cronograma_2018_02_03.pdf	07/03/2018 17:21:16	Jose Eduardo Krieger	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HipercolBrasil_versao3_1.pdf	10/02/2017 15:18:58	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HipercolBrasil_06_2016.docx	05/10/2016 10:02:58	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto_HF_final.pdf	13/07/2012 11:49:17		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 27 de Novembro de 2019

**Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador(a))**

12.1. Apêndice C

Artigo “Screening of *ABCG5* and *ABCG8* genes for sitosterolemia in a familial hypercholesterolemia cascade screening program” publicado na revista *Circulation: Genomics and Precision Medicine*

Circulation: Genomic and Precision Medicine

ORIGINAL ARTICLE

Screening of *ABCG5* and *ABCG8* Genes for Sitosterolemia in a Familial Hypercholesterolemia Cascade Screening Program

Mauricio Teruo Tada¹, BSc; Viviane Zorzaneli Rocha², MD, PhD; Isabella Ramos Lima, BSc; Théo Gremen Mimary Oliveira, MSc; Ana Paula Chacra³, MD, PhD; Marcio Hiroshi Miname⁴, MD, PhD; Valéria Sutti Nunes⁵, PhD; Edna Regina Nakandakare, MD, PhD; Maria Helene Costa Gurgel Castelo⁶, MD, PhD; Cinthia Elim Jannes, PhD; Raul D. Santos⁷, MD, PhD; José Eduardo Krieger⁸, MD, PhD; Alexandre Costa Pereira⁹, MD, PhD

BACKGROUND: Sitosterolemia is a rare autosomal recessive disorder caused by homozygous or compound heterozygous variants in *ABCG5/ABCG8*. The disease is characterized by increased plasma plant sterols. Small case series suggest that patients with sitosterolemia have wide phenotypic heterogeneity with great variability on either plasma cholesterol levels or development of atherosclerotic cardiovascular disease. The present study aims to characterize the prevalence and clinical features of sitosterolemia participating in a familial hypercholesterolemia genetic cascade screening program.

METHODS: From 443 familial hypercholesterolemia index cases, 260 were negative for familial hypercholesterolemia genes and were sequenced for the *ABCG5/8* genes. Clinical and laboratory characteristics of affected individuals were determined.

RESULTS: Eight (3.1%) index cases were found to be homozygous or compound heterozygous variant for *ABCG5/ABCG8* genes, confirming the genetic diagnosis of sitosterolemia. Screening their relatives led to the identification of 6 additional confirmed sitosterolemia cases (3 homozygous and 3 compound heterozygous variant) and 18 carriers (heterozygous). The mean age of identified sitosterolemia cases (n=14) was 37.2±19.8 years, 50% were females, and 78.6% (all adults) presented either clinical or subclinical atherosclerotic cardiovascular disease. As expected, affected individuals presented elevated plasma plant sterol levels (mean β-Sitosterol and campesterol, respectively, 160.3±107.1 and 32.0±19.6 μg/mL) and the highest plasma LDL (low-density lipoprotein)-cholesterol was 269.0±120.0 mg/dL (range: 122–521 mg/dL). LDL-cholesterol mean reduction with therapy among cases was 65%. Eighty-three percent (83%) of identified sitosterolemia patients presented hematologic abnormalities.

CONCLUSIONS: Testing genes associated with sitosterolemia in the molecular routine workflow of a familial hypercholesterolemia cascade screening program allowed the precise diagnosis of sitosterolemia in a substantial number of patients with varying LDL-C levels and high incidence of early atherosclerotic cardiovascular disease and hematologic abnormalities.

Key Words: atherosclerosis ■ campesterol ■ myocardial infarction ■ prevalence ■ sitosterolemia ■ sitosterols ■ xanthomatosis

Sitosterolemia (OMIM 210250/618666) is a rare autosomal recessive disorder first described by Bhattacharyya and Connor in 1974. It is characterized by increased plant sterol circulating levels, associated with xanthomas and premature atherosclerosis.^{1–3} It is caused by homozygous or compound heterozygous

variants in *ABCG5* or *ABCG8* genes, which encode the transporters *ABCG5/ABCG8*, responsible for the sterol efflux back to the intestinal lumen and into the bile. In the case of a nonfunctional or dysfunctional transporter, this efflux is impaired, leading to sterol accumulation.^{4,5} Normally, people absorb <5% of phytosterols, but due

Correspondence to: Alexandre Costa Pereira, MD, PhD, Lab of Genetics & Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), 44 Dr. Enéas de Carvalho, Aguiar Ave—Block II—10th floor, 05403-900, São Paulo, Brazil. Email mauricio.teruo@usp.br

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCGEN.121.003390>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 209.

© 2022 American Heart Association, Inc.

Circulation: Genomic and Precision Medicine is available at www.ahajournals.org/journal/circgen

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ASCVD	atherosclerotic cardiovascular disease
FH	familial hypercholesterolemia
IC	index case
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
LP	likely pathogenic
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

to intestinal hyperabsorption and low biliary excretion, sitosterolemic patients have a 30- to 100-fold increase in the plasma concentration of plant sterols, especially sitosterol, campesterol, and stigmasterol.^{4,6-9}

Individuals with sitosterolemia have marked phenotypic heterogeneity, ranging from normocholesterolemia to hypercholesterolemia associated with xanthomas.^{6,10} It is hypothesized that the accumulation of cholesterol and phytosterols in the blood may lead to the formation of tendon xanthomas and premature atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD), including angina, acute myocardial infarction, and sudden death.^{2,11} However, the specific causal role of plant sterols in premature ASCVD has been questioned considering the concomitant elevation of plasma cholesterol and the limited number of published case series of the disease.¹²

Other clinical signs may occur, such as hematologic abnormalities, including the presence of stomatocytes, thrombocytopenia, and macrothrombocytopenia, which can be the result of accumulated plant sterols and their incorporation into red blood cells and platelets, leading to abnormal morphology and function.^{6,11,13,14}

In the laboratory routine, the enzymatic colorimetric methods for dosage of cholesterol concentration cannot distinguish between cholesterol and phytosterol. Thus, to discriminate against sterols, the use of gas chromatography, gas chromatography/mass spectrometry or high-pressure liquid chromatography are needed.⁶

The *ABCG5/ABCG8* genes, knowingly implicated in sitosterolemia, were first reported by Berge et al.^{7,15} These genes are highly expressed in the liver and intestine and are located side by side on chromosome 2p21, and each gene comprises 13 exons encoding a half-functional protein that together form a heterodimer transporter.^{4,7,11} This transporter is responsible to pump sterols (cholesterols and phytosterols) from small intestine enterocytes into the gut lumen and from hepatocytes into the bile ducts.^{1,5,11}

The exact incidence of sitosterolemia is not clear. To date, only ≈100 patients have been reported in the world to have sitosterolemia, so it is considered an extremely rare disease.^{11,16} Tada et al^{6,16} estimated the incidence of sitosterolemia based on the presence of loss of function heterozygous variants in *ABCG5* or *ABCG8* genes

in the Exome Aggregation Consortium, concluding that sitosterolemia could have a incidence of 1:200 000 individuals. A recent study aimed to examine the relationship between hypercholesterolemia and sitosterolemia in a cohort with 207 926 subjects found that 0.05% had beta-sitosterol levels ≥15 µg/mL, values that are consistent with sitosterolemia.¹⁷

To our knowledge, in Brazil there are no reported cases of sitosterolemia with a positive molecular diagnosis, and in Latin America there is only one reported case, making the occurrence and frequency of this condition as well as its possible clinical consequences unknown in the region.¹⁸ Since sitosterolemia and familial hypercholesterolemia (FH), especially the homozygous form, may share a similar phenotype, the routine evaluation of variants affecting *ABCG5* and *ABCG8* genes on a routine panel of next generation sequencing performed for FH screening may be useful to increase the diagnosis of sitosterolemia.¹⁹ Thus, this study aimed to evaluate the presence of variants associated with sitosterolemia and describe clinical and laboratory characteristics of affected individuals, especially the presence of ASCVD, in a large cohort of individuals participating on an FH cascade screening program.²⁰

METHODS

Study methods can be found in the Supplemental Material. This study was approved by the Institutional Ethics Committee (CAPPesq number 3757/12/013) and was conducted at the Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology of Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School Hospital, São Paulo, Brazil. Written informed consent was obtained from all subjects, and in the case of underage individuals (<18 years old), written informed consent was obtained from their legal representative. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

RESULTS

Genetic Sequencing

Among all 443 sequenced patients, 147 (33%) tested positive for FH pathogenic or likely pathogenic variants (for *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* genes), 260 (59%) were negative in the molecular test (FH negative), and 36 (8%) presented variants with uncertain significance (for *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE*, and *STAP1* genes). All FH negative patients were divided into 2 groups: (1) those with a clinical/laboratorial suspicion of sitosterolemia: 42 individuals with the previously mentioned criteria; (2) those without a clinical/laboratorial suspicion of sitosterolemia: 218 individuals (Figure 1).

A final molecular diagnosis of sitosterolemia was confirmed in 7 (2.7%) FH negative index case (ICs). In one patient, it was not possible to confirm its phase

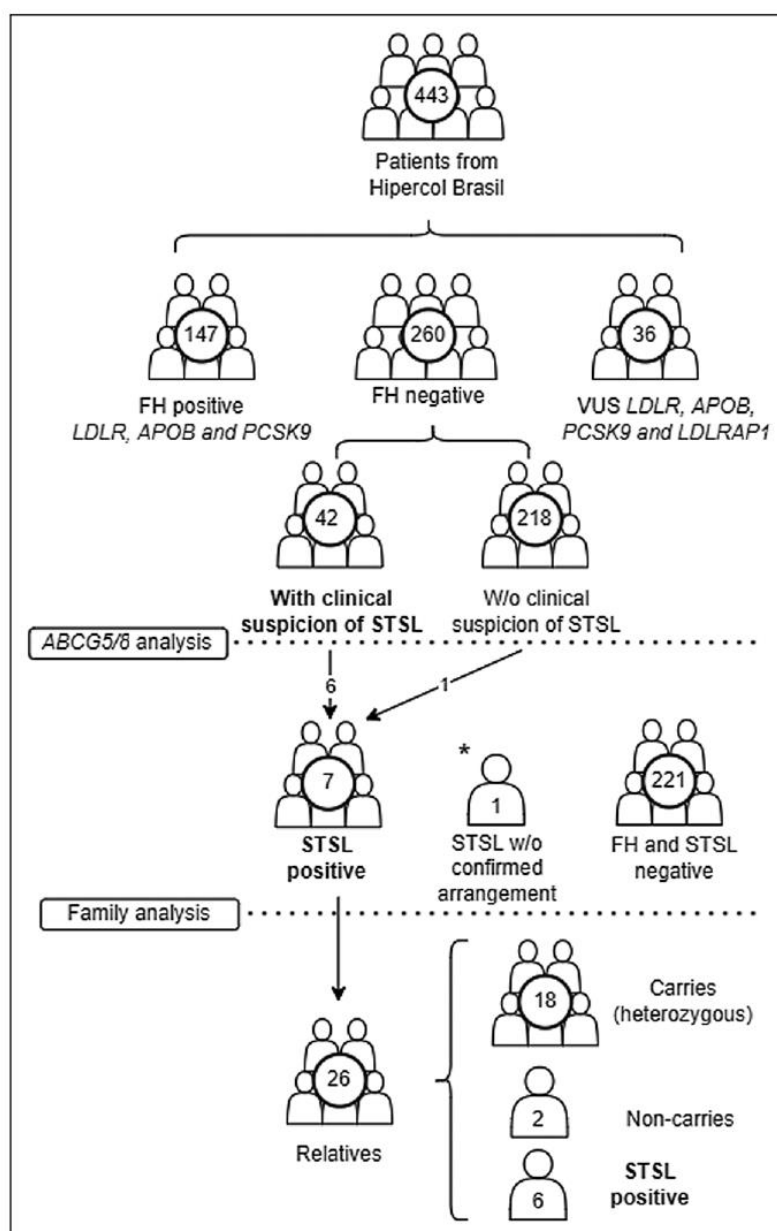


Figure 1. Flow diagram showing the results of all sequenced index cases (ICs).

Family members of positive sitosterolemia (STSL) were recruited and their results are represented. *Trans arrangement was not confirmed; however, additional information can be seen on the supplement. FH indicates familial hypercholesterolemia.

arrangement (an 11 years old girl from family H). All patients but one (IC from family E) were from the group with a clinical suspicion of sitosterolemia. Clinical and laboratory characteristics of molecularly defined sitosterolemia and FH negative/sitosterolemia negative are described in Table 1. Sitosterolemia cases are younger than FH/sitosterolemia negative patients ($P=0.022$), presented lower baseline or current TG ($P=0.014$ and $P=0.003$, respectively), have a better response with the use of lipid lowering therapies, and a higher prevalence of ASCVD ($P<0.001$). We also sought to describe the prevalence of pathogenic (P) or likely pathogenic (LP) variants

in heterozygosis among our cohort. We identified 4 heterozygous carriers (1.5%) among FH negative individuals and 2 heterozygous carriers (1.4%) among FH positive individuals. The allele frequency of *ABCG5/ABCG8* heterozygous carriers within our FH cohort was then compared with the frequency of P and LP *ABCG5/ABCG8* carriers among 200643 UK Biobank participants with Whole Exome Sequencing data available. Using the same criteria for variant classification, we observed 332 heterozygous carriers of rare P or LP variants in *ABCG5* (190 participants) and *ABCG8* (142 participants). No homozygous or compound heterozygous carrier was observed

Table 1. Clinical and Laboratory Characteristics of Index Cases Molecularly Defined STSL and FH Negative/STSL Negative

Parameter	FH negative (260)		P value
	Molecularly defined STSL (n=7)	STSL negative (n=253)	
Age, y	25 (10–44)	48 (32–59)	0.022*
Female sex, %	5 (71.4)	172 (68.0)	0.604
Male sex, %	2 (28.6)	81 (32.0)	0.604
White, %	4 (66.7)	123 (59.4)	0.853
Pardo, %	2 (33.3)	60 (29.0)	0.853
Black, %	0 (0.0)	21 (10.1)	0.853
Other or nondeclared ethnicity, %	0 (0.0)	3 (1.4)	0.853
Baseline TC, mg/dL	418.0 (262.0–480.0)	326.0 (303.8–361.0)	0.102
Baseline LDL-C, mg/dL	352.0 (203.0–462.0)	241.0 (221.0–263.0)	0.060
Baseline HDL-C, mg/dL	47.0 (41.0–47.0)	53.0 (45.0–67.0)	0.145
Baseline TG, mg/dL	88.0 (63.0–126.0)	141.0 (97.0–205.0)	0.014*
Pharmacological treatment, %	6 (85.7)	153 (61.2)	0.181
Statin	5 (71.4)	138 (60.5)	0.437
Ezetimibe	2 (28.6)	45 (20.3)	0.439
Current TC, mg/dL	162.0 (157.0–220.0)	305.5 (255.0–342.8)	<0.001*
Current LDL-C, mg/dL	101.0 (93.0–137.0)	223.0 (171.5–249.5)	<0.001*
Current HDL-C, mg/dL	55.0 (47.0–58.0)	51.0 (44.0–62.0)	0.639
Current TG, mg/dL	74.0 (56.0–92.0)	138.0 (95.5–187.5)	0.003*
Xanthelasma, %	3 (42.9)	23 (9.3)	0.025*
Xanthoma, %	4 (57.1)	9 (3.6)	<0.001*
Corneal arcus, %	1 (14.3)	16 (6.5)	0.389
Hypertension, %	1 (20.0)	57 (38.5)	0.371
Diabetes, %	0 (0.0)	29 (19.3)	0.350
Smoking, %	1 (20.0)	74 (35.1)	0.432
BMI, kg/m ²	18.8 (17.8–19.4)	27.2 (23.7–31.9)	0.004*
ASCVD, %	5 (100.0)	43 (17.8)	<0.001*
Early ASCVD, %	2 (40.0)	28 (11.6)	0.189
ASCVD subclinical, %	2 (40.0)	6 (2.5)	0.189
Family history of early ASCVD, %	4 (66.7)	109 (53.7)	0.421
Children, %	2 (28.6)	43 (17.0)	0.348

Pardo is used in Brazil to describe a mixed individual; for baseline cholesterol levels we considered the cholesterol levels without medication or the highest values with medication; early ASCVD: male <55 and female <65 y old; pharmacological treatment refers to the day the patient was recruited to the program; quantitative variables are expressed as median (quartile 1–quartile 3). Categorical variables are expressed as absolute values and percentage. Race, diabetes, hypertension, and early ASCVD have not been evaluated in children. ASCVD indicates atherosclerotic cardiovascular disease; BMI, body mass index; FH, familial hypercholesterolemia; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; STSL, sitosterolemia; and TC, total cholesterol.

in UK Biobank participants. Heterozygous carriers for *ABCG5/ABCG8* LP or P variants were 8.3× more frequent in our FH cohort than in the general population ($P=0.0001$) suggesting that in addition to the relatively high number of sitosterolemia cases among our FH cohort, *ABCG5/ABCG8* pathogenic variants in heterozygosity may also play a role in severe dyslipidemia. Clinical and laboratory characteristics of the heterozygous carriers of our cohort are described in Table S1, and the variants found are described in Table S2. All the UK Biobank P or LP variants are described in Table S3.

Table 2 shows the 9 encountered P or LP variants in *ABCG5* and *ABCG8* among sitosterolemia cases. These variants included 4 nonsense, 2 small deletions, 2 missense, and 1 splice-site variant. All nonsense and one missense variants were previously reported and the other variants were novel.

Screening of 26 relatives in 8 families (A to H) led to the identification of 6 additional sitosterolemic patients, 18 heterozygous and 2 individuals without any pathogenic variant. The clinical and laboratory characteristics of all 14 homozygous or compound heterozygous variant

Table 2. Variants Found in ABCG5 (NM_022436.2) and ABCG8 (NM_022437.2) Genes

Gene	Variant	Variant type	Carrier family	In silico prediction	gnomAD	ABraOM	Kaviar	Medical literature	ACMG criteria	ACMG classification
ABCG5	p.(Gln22*) c.64C>T	Nonsense	F	Disease causing	0.00004456	...	0.000071	Su (2006)	PVS1, PM2, PM3, PP4, PP5	Pathogenic
ABCG5	p.(Arg389His) c.1166G>A	Missense	G	Conflicting	0.0001485	...	0.000122	Huang D et al (2019)	PS3, PM2, PP1, PP4, PP5	Likely pathogenic*
ABCG5*	p.(Arg389Cys) c.1165C>T*	Missense*	G*	Disease causing*	0.00001988*	...	0.000019*	...	PM2, PM3, PP3, PP4*	Likely pathogenic*
ABCG5*	p.(Phe630fs 8) c.1889_1889delT*	Small deletion*	F*	Disease causing*	...	0.0000821*	0.000006*	...	PVS1, PM2	Likely pathogenic*
ABCG8	p.(Trp361*) c.1083G>A	Nonsense	A, C, H	Disease causing	0.00009374	...	0.000998	Berge KE et al (2000)	PVS1, PP4, PP5	Pathogenic
ABCG8*	c.1212-1G>C*	Splice site*	B*	Disease causing*	0.00003187*	PVS1, PM2	Likely pathogenic*
ABCG8	p.(Arg412*) c.1234C>T	Nonsense	C	Disease causing	0.00009194	...	0.000090	Berge KE et al (2000)	PVS1, PM2, PP4, PP5	Pathogenic
ABCG8	p.(Tyr492*) c.1476T>A	Nonsense	B, D, E	Disease causing	0.00003580	...	0.000052	Hensel B et al (2014)	PVS1, PM2, PP5	Likely pathogenic
ABCG8*	p.(Ser609Thrfs 54) c.1826delG*	Small deletion*	D, H*	Disease causing*	PVS1, PM3	Likely pathogenic*

In silico predictions for all nonsense and frameshift variants were classified using Mutation Taster software; ▲splice site variant was predicted by Human Splice Finder software to have an alteration of the wild type acceptor site; missense variants were predicted by Provan, SIFT, PolyPhen-2 and Mutation Taster software; the presence of scientific publication was searched in Pubmed, ClinVar, LOVD, and HGMD databases. ACMG indicates American College of Medical Genetics and Genomics.

*Novel variants.

individuals (relatives included) are described in Table 3. The mean age was (37.2±19.8 years), 50% were females, and 78.6% (all the adults from the cohort) presented ASCVD, either manifest or subclinical, but mostly clinically manifest. In addition, all adults had premature atherosclerosis, established before the age of 49 years. Interestingly, all patients who underwent carotid ultrasound for further atherosclerosis screening (n=5) also exhibited the presence of atherosclerosis in this arterial bed.

The mean β -sitosterol and campesterol levels were, respectively, 160.3±107.1 and 32.0±19.6 μ g/mL among the sitosterolemic patients, and thus 44x and 18x increased relative to heterozygous relatives (n=11), in whom mean β -sitosterol and campesterol levels were 3.6±2.5 and 1.8±1.2, respectively, and 126x and 55x increased relative to controls, in whom mean β -sitosterol and campesterol levels were 1.3 and 0.6, respectively (Figure S2). The highest, lowest, and current LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol) measurements are also shown in Table 3. The highest mean plasma LDL-C was 269.0±120.0 mg/dL, ranging from 122 to 521 mg/dL, and the use of lipid lowering therapies by a few patients during evaluation could be a reason for such wide variability. Of importance, lipid lowering therapy was associated with a 64.5% reduction in LDL-C, resulting in a lowest mean plasma LDL-C of 95.5±38.2 mg/dL (ranges: 56–211 mg/dL), while plant sterols concentrations were still significantly elevated. Hematologic abnormalities were seen in 83.3% of those undergoing a complete blood count, and the most frequent disorder was thrombocytopenia (Table S4).

Figure 2 shows clinical, molecular, and laboratory characteristics of individuals from the 8 screened families, while Figure 3 shows cutaneous and tendon findings of a few of the affected subjects. Additional relevant information regarding each of the screened families is described on the Supplemental Material (Supplemental Family Description).

From the 147 patients presenting a P or LP variant for FH, we could ascertain data from 47 patients who had at least one consultation at our hospital. Patients with FH and sitosterolemia were included in the program HipercolBrasil at the ages of 40.4±21.1 and 32.5±17.0 years, respectively (P=0.104). Compared with the group of FH patients, patients with sitosterolemia had a similar proportion of females (51.1% versus 53.8%, P=0.859, respectively, in FH and sitosterolemia), and no significant difference in the diagnosis of arterial hypertension (36.2% and 41.7%, P=0.748), current smoking (12.8% versus 16.7%, P=0.660), and family history of premature coronary heart disease (44.7% versus 75%, P=0.120). The diagnosis of diabetes was present in 14.9% of FH patients and no patient in the sitosterolemia group (P=0.326). While the mean highest LDL-C was similar in both groups (281±72 versus 288±116, P=0.763, respectively, in FH and sitosterolemia), sitosterolemia

Table 3. Clinical and Biochemical Characteristics of All Homozygous (n=5) or Compound Heterozygous (n=9) Individuals

Individual	Age	Family history of ASCVD	Xanthoma/Xanthelasma		Manifest or sub-clinical ASCVD		Carotid atherosclerosis		LDL-C, mg/dL			β-Sitosterol, μg/mL	Carnes-terol, μg/mL	Hematologic alteration
			Presence	Age	Presence	Age	Presence	Age	Current	Lowest	Highest			
A-II:1*	25	No	Yes/No	5	Yes/mfst	25	Yes	23	93 ^(1,2)	93 ^(1,2)	352 ⁽¹⁾	214.43 ⁽¹⁾	49.65 ⁽¹⁾	No
A-II:3	39	No	Yes/No	10	Yes/mfst	32	Yes	36	157 ^(1,2)	58 ^(1,2)	250 ^(1,2)	243.14 ⁽¹⁾	51.57 ⁽¹⁾	Yes
B-II:2*	43	Yes	Yes/Yes	38	Yes/subclin	40	196 ^(1,2)	93 ^(1,2)	196 ^(1,2)	107.33 ^(1,2)	18.07 ^(1,2)	Yes
C-II:1*	28	No	No/No	...	Yes/mfst	20	Yes	25	57 ^(1,3)	57 ^(1,3)	203 ⁽³⁾	263.93 ⁽³⁾	51.91 ⁽³⁾	Yes
D-II:2*	11	No	No/No	...	No	137 ^(1,2)	95 ^(1,2)	462 ⁽¹⁾	136.01 ^(1,2)	18.45 ^(1,2)	Yes
D-II:1	3	No	Yes/No	3	No	251 ⁽⁰⁾	211 ⁽⁰⁾	251 ⁽⁰⁾	429.90 ⁽⁰⁾	68.94 ⁽⁰⁾	Yes
E-II:3*	45	Yes	No/No	...	Yes/mfst	40	Yes	44	101 ^(1,2)	84 ^(1,2)	295 ⁽¹⁾	78.12 ⁽¹⁾	16.12 ⁽¹⁾	Yes
E-II:2	44	Yes	No/No	...	Yes/mfst	40	88 ^(1,2)	56 ^(1,2)	215 ⁽¹⁾	181.67 ⁽¹⁾	50.06 ⁽¹⁾	Yes
F-II:1*	48	Yes	Yes/Yes	...	Yes/subclin	40	Yes	45	103 ^(1,2,4)	90 ^(1,2)	521 ^(2,3)	53.41 ^(1,2,4)	11.29 ^(1,2,4)	Yes
G-II:3*	46	No	Yes/No	...	Yes/mfst	31	89 ⁽¹⁾	89 ⁽¹⁾	223 ⁽¹⁾	74.53 ⁽¹⁾	16.68 ⁽¹⁾	Yes
G-II:1	49	No	Yes/No	...	Yes/mfst	42	122 ^(2,4)	122 ^(2,4)	122 ^(2,4)	46.88 ^(2,4)	9.67 ^(2,4)	-
G-II:2	51	No	No/Yes	...	Yes/mfst	49	126 ⁽⁵⁾	108 ⁽⁵⁾	126 ⁽⁵⁾	122.83 ⁽⁵⁾	26.42 ⁽⁵⁾	No
G-I:1	78	No	No/No	...	Yes/mfst	45	107 ⁽¹⁾	84 ⁽¹⁾	172 ⁽⁰⁾	132.01 ⁽¹⁾	26.81 ⁽¹⁾	Yes
H-II:1††	11	No	Yes/No	7	No	97 ^(2,4)	97 ^(2,4)	378 ^(2,4)	-	-	-

... indicates lack of information; ASCVD, atherosclerotic cardiovascular disease; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; and STSL, sitosterolemia.

*Index case; lack of information; hematologic alteration is defined as presence of thrombocytopenia, macrothrombocytopenia, anemia, and alteration in erythrocyte morphology; mfst: manifest; subclin: subclinical; 0: baseline; 1: atorvastatin; 2: ezetimibe; 3: rosuvastatin; 4: cholestiramine; 5: simvastatin. It was not considered as a positive family history of ASCVD if the only family member with ASCVD was also positive for STSL. Hematologic alterations are described in Table S4.

†Trans arrangement was not confirmed genetically but suspected clinically.

patients were able to reach significantly lower LDL-C levels during follow-up (163 ± 79 versus 98 ± 43 , $P=0.003$). Yet, in both groups, there was a high proportion of patients with history of clinical coronary heart disease (42.6% versus 66.7%, $P=0.135$, respectively, in FH and sitosterolemia), and the mean age of event presentation was significantly earlier among the sitosterolemia patients. An additional 17% and 15.3% of the FH and sitosterolemia groups had subclinical coronary atherosclerosis ($P=0.5$). Considering only adults (age ≥ 18 years old, $n=34$ for FH, $n=10$ for sitosterolemia), 82.4% and 100% of patients with FH and sitosterolemia had either manifest or sub-clinical disease ($P=0.310$; Table S5)

In this study, there was a high prevalence of premature coronary heart disease in both FH and sitosterolemia patients, but in the sitosterolemia group, coronary events were particularly precocious. Interestingly, on-treatment LDL-C levels could be more significantly lowered in sitosterolemia patients, reinforcing the relevance of early diagnosis and treatment for disease prevention.

DISCUSSION

This study aimed to screen for pathogenic or likely pathogenic variants in *ABCG5* and *ABCG8* genes and to describe the clinical and laboratory characteristics of carrier individuals in a FH cohort with a negative molecular test for FH. All subjects were recruited from a genetic cascade screening program, HipercolBrasil, performed at a tertiary hospital in the city of São Paulo. Overall, 14 genetically confirmed sitosterolemia from 8 families were

encountered by evaluating IC and conducting cascade screening. Identified subjects presented elevated plasma plant sterol levels, high frequency of cutaneous stigmata and elevated LDL-C levels, with a large variability on the highest available LDL-C concentrations and a substantial response to treatment. Most importantly, a very high frequency of early ASCVD and hematologic abnormalities was present in newly sitosterolemia identified cases.

Classically, sitosterolemia has been considered on the differential diagnosis of homozygous FH due to high LDL-C and early onset xanthomas.^{1,19} Other considered phenocopies are autosomal recessive hypercholesterolemia or lysosomal acid lipase deficiency. Both FH and autosomal recessive hypercholesterolemia affect LDL-cholesterol homeostasis leading to hypercholesterolemia and premature ASCVD.^{1,21}

Overall, those who were negative for variants on the canonical FH causing genes and were suspected of sitosterolemia presented with more severe hypercholesterolemia and higher frequency of xanthomas than those without clinical suspicion. Nonetheless, the clinical presentation of these cases was not always assumed to be typical of homozygous FH. In addition, no differences were detected on the frequency of previous ASCVD events between heterozygous FH and sitosterolemia. Nevertheless, among those with proven sitosterolemia, almost all adults (82%) had previous symptomatic ASCVD, a finding that supports previous associations of this disease with a heightened risk of atherosclerosis.^{10,22}

Despite the fact that sitosterolemia is usually a differential diagnosis of homozygous FH, a great variability in

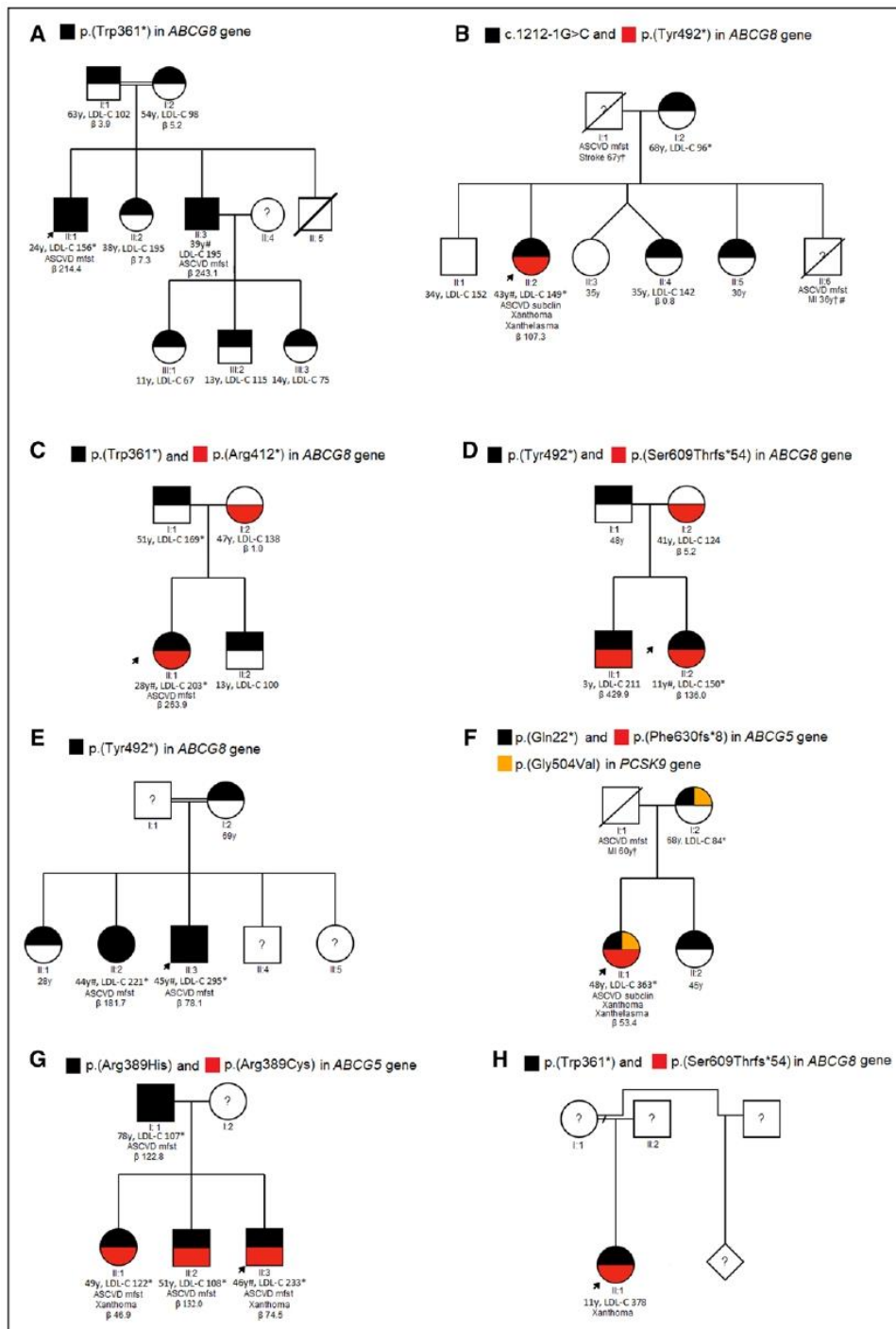


Figure 2. Pedigrees of families in which a pathogenic or a likely pathogenic variant in *ABCG5/ABCG8* genes were found.

Age in years. Total cholesterol (TC) and LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol) in mg/dL and are referring to entry into the program. β : β -Sitosterol in μ g/mL. Atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) mfst: manifest atherosclerotic cardiovascular disease. ASCVD subclin: subclinical atherosclerotic cardiovascular disease. MI: myocardial infarction. *With medication; #Hematologic alteration (thrombocytopenia, macrothrombocytopenia or anemia); ?Genetic test was not performed; †death cause; ‡index case; full shaded indicates homozygote and half-shaded indicate heterozygotes.

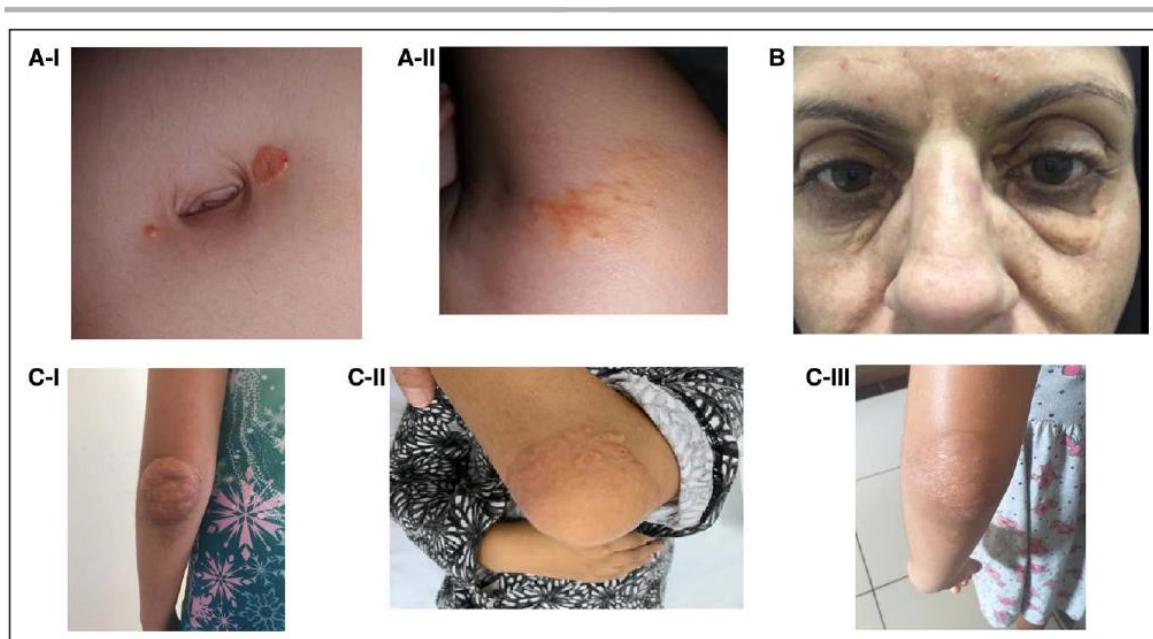


Figure 3. Clinical characteristics found in patients with sitosterolemia.

A, Xanthoma on periumbilical (I) and posterior axillary (II), respectively, of the relative II:2 from family D. **A**, Xanthoma on periumbilical (I) and posterior axillary (II), respectively, of the relative II:2 from family D. **B**, Bilateral xanthelasma of the index case (IC) II: 1 from family F. **C**, Xanthoma on elbow before treatment (I), after 6 mo (II) and after 1 y of treatment (III), respectively, of the IC II:1 from family H.

LDL-C levels was found, with only 1 (7.1%) and 4 cases (28.6%), respectively, presenting LDL-C >500 or >350 mg/dL on pharmacological therapy, the clinical criteria generally used in the diagnosis of homozygous FH.²³ This observation clearly suggests that sitosterolemia should be a differential diagnosis not only of homozygous FH but also of severe hypercholesterolemia overall. The interindividual and intraindividual variations of total cholesterol and LDL-C in the sitosterolemic patients may result from the variable use and proper adherence to diet and pharmacological therapy.

To the best of our knowledge, only 80 variants in the *ABCG5/8* genes were reported to be associated with sitosterolemia, 38 and 42 variants located in *ABCG5* and *ABCG8* genes, respectively.²⁴ We identified 9 different genetic variants in 8 nonrelated patients, including 4 new variants: 1 missense, 2 small deletions, and 1 splice site variants. Four homozygous patients were identified, coming from first-degree cousins in 2 different families. In only one patient, it was not possible to confirm the *trans* arrangement; however, the patient was a 11 year-old girl with a severe phenotype, including hypercholesterolemia, xanthomas (see Figure 3C), and a dramatic response to the use of ezetimibe in combination with rosuvastatin. The severity of this case suggests the arrangement could be in *trans*. Plant sterol analysis was not available in this case.

We have also studied the prevalence of P or LP *ABCG5/ABCG8* variants in heterozygosis in our FH cohort. Additional analysis of loss of function variants in heterozygosis in FH negative group showed 4 carriers,

with a mean current LDL-C of 203.0 mg/dL. None of them presented clinical signs, one presented manifest, and the other subclinical ASCVD. All 4 ICs presented a family history of ASCVD. Among FH positive group, beyond the FH variant, 2 ICs were carriers of loss of function variant in heterozygosis, presenting 227.5 mg/dL of mean LDL-C, without clinical signs or ASCVD. Interestingly, we observed a 8-fold enrichment of damaging variants in heterozygosis in FH individuals when compared with >200 000 participants of the UK Biobank study. The significant enrichment was observed both in the group of mutation negative, as well as, those with an FH causing mutation, suggesting that rather than causal, presence of damaging *ABCG5/ABCG8* genetic variants in heterozygosis modulates the phenotype, possibly increasing the penetrance of, or compounding, other genetic causes of the condition.

Currently, the major diagnostic criterion of sitosterolemia is the presence of serum β -sitosterol above 10 μ g/mL, and a recent study showed a higher positive predictive value when a cut off of 15 μ g/mL of β -sitosterol was adopted. All our sitosterolemic patients had a β -sitosterol level above 15 μ g/mL, with the lowest measured value $\approx 3\times$ higher than this cut off. Lathosterol and desmosterol concentrations were measured as cholesterol synthesis markers, and they did not show any significant difference between groups.

A recent study performed by Nomura et al¹⁵ concluded that patients with loss of function variants in heterozygosis in *ABCG5* gene have increased β -sitosterol and

LDL-C levels and a 2-fold increase in risk of coronary artery disease. In our series, the majority of our families presented variants in *ABCG8* gene, and only 2 heterozygous carriers carry *ABCG5* gene variants, and of these only one had LDL-C measured (84 mg/dL) and did not present a history of ASCVD, and she was also a carrier of a variant with uncertain significance variant in *PCSK9* gene (Family F - I:2). In this case, β -sitosterol level was not available. The other 16 heterozygous carriers carry *ABCG8* gene variants, with mean β -sitosterol and LDL-C levels of 3.6 ± 2.5 $\mu\text{g/mL}$ and 107.5 ± 33.7 mg/dL, respectively. None of them presented a history of ASCVD.

The treatment of sitosterolemia aims to reduce plasma plant sterols and cholesterol as much as possible and is based on a restrictive diet with low plant sterols ingestion and use of medications that inhibit intestinal absorption, such as ezetimibe, or a bile acid sequestrant, such as cholestyramine. The use of medication can prevent the formation or reduce the number and size of xanthomas.² The cholesterol levels of sitosterolemic patients may vary greatly with diet and usually do not respond well to the use of statins. In fact, statins, have not been shown to be effective in lowering plasma plant sterols.^{2,6,7,25} However, a recent study showed that a combination of atorvastatin and ezetimibe might be more beneficial in patients with genetic confirmed sitosterolemia than in those without genetic confirmation.²⁶ Indeed, in this study the association of diet, statins and ezetimibe was associated with a robust reduction in LDL-C levels, despite the persistently elevated levels of plant sterols. Whether the high concentrations of plant sterols contribute to a residual risk of ASCVD in treated patients remains to be determined, considering the established causal role of LDL-C in atherogenesis but ongoing controversies on the role of plant sterols in this process.^{10,22} Hansel et al¹² reported 5 genetically confirmed sitosterolemia cases that after treatment had their cholesterol levels normalized, and despite still high levels of phytosterols, no single patient in this cohort presented manifest or subclinical ASCVD. In our series, all of our 11 adult patients with confirmed sitosterolemia had clinically manifest or subclinical ASCVD along with elevated β -sitosterol levels and mixed cholesterol levels but most not at goal. Additional studies are required to further support the possible association between sitosterolemia and atherosclerosis. Finally, the role of novel lipid-lowering therapies in sitosterolemia is unclear. Although in a small cohort of patients, PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) inhibition was associated with reduced cholesterol absorption markers, studies with PCSK9 inhibitors conducted specifically in sitosterolemic individuals are lacking.²⁷

Study Limitations

This study has some limitations. The high positivity of patients found in this study might not be representative

of a cascade genetic screening program due to potential selection bias result of the inclusion of patients with clinical suspicion of sitosterolemia. Analysis of a few families does not provide information that could be directly extrapolated to the entire Brazilian population of hypercholesterolemic individuals. It was not possible to perform a systematic screening for subclinical ASCVD in patients who had a negative result for either FH or sitosterolemia in our cohort since they were not all being followed at our institution. However, the elevated number of cases and the careful clinical and laboratory characterization add important information about this rare disease.

Conclusions

In conclusion, the sequencing analysis of *ABCG5/8* in a Brazilian hypercholesterolemic cohort lead to the identification of 14 patients with sitosterolemia with an elevated rate of early ASCVD manifestations and a significant response of LDL-C to therapy. The study showed the importance of implementing genes associated with sitosterolemia in the FH genetic screening workup. In hypercholesterolemic patients with xanthomas, early ASCVD, a good response to therapy, unexplained anemia or low platelet counts, and the absence of family history of hypercholesterolemia, sitosterolemia investigation is granted.

ARTICLE INFORMATION

Received June 14, 2021; accepted March 10, 2022.

Affiliations

Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology (LIM13) (M.T.T., I.R.L., T.G.M.O., C.E.J., J.E.K., A.C.P.) and Lipid Clinic, Heart Institute (InCor) (V.Z.R., A.P.C., M.H.M., R.D.S.), University of São Paulo Medical School Hospital. Laboratório de Lipídeos (LIM10), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo (V.S.N., E.R.N.). Medical School, Federal University of Ceará, Fortaleza (M.H.C.G.C.). Academic Research Organization, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil (R.D.S.). Genetics Department, Harvard Medical School, Boston, MA (A.C.P.).

Acknowledgments

Dr Santos is a recipient of a scholarship from the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) process No. 303734/2018-3, Brazil. Dr Jannes, I.R. Lima, M.T. Tada selected and collected data from all patients. I.R. Lima and M.T. Tada were responsible for performing the genetic tests and to analyze the cases. M.T. Tada, Dr Pereira, Dr Rocha, and Dr Santos were responsible for article writing and literature review. Drs Nakandakare and Nunes performed the biochemical dosage of phytosterol. Dr Jannes is responsible for coordinating the screening program, and Dr Pereira is the principal investigator. Drs Rocha, Pereira, Costa Gurgel Castelo, Santos, Miname, Chacra were responsible for clinical support and treating the patients. T.G.M. Oliveira, Dr Jannes, I.R. Lima, Dr Rocha, Dr Santos, Dr Krieger, and Dr Pereira were responsible for article and data review and scientific support. All authors read and approved the final article.

Sources of Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

Disclosures

Dr Rocha declares honoraria for speaker activities from Amgen, Astra Zeneca and Novo-Nordisk. Dr Miname has received honoraria for speaker activities from Amgen. Dr Santos has received honoraria related to consulting, research, and

